

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**„Mutationsanalyse im p53 Gen bei
Patienten mit Multipler Sklerose“**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Michael Glas
aus Bayreuth

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. W. Brück
2. Prof. Dr. F. Zipp
3. Prof. Dr. P. Rieckmann

Datum der Promotion: 31.10.2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1. Multiple Sklerose	
1.1.1. Definition der Multiplen Sklerose	5
1.1.2. Epidemiologie	5
1.1.3. Genetische Einflüsse	6
1.1.4. Klinische Symptomatik und Diagnostik	7
1.1.5. Verlaufsformen	8
1.1.6. Therapie der MS	10
1.2. Histopathologie	
1.2.1. MS-Plaques	11
1.2.2. Oligodendrozytenpathologie der MS	11
1.2.3. Immunpathologie der MS	12
1.3. Apoptose	
1.3.1. Die Apoptosekaskade	13
1.3.2. Apoptose von T-Zellen in MS und EAE	15
1.3.3. Apoptose und Oligodendrozyten	16
1.4. p53	
1.4.1. Struktur, Regulation und Funktion	18
1.5. Aufgabenstellung	21
2. Material und Methoden	
2.1. Material	22
2.2. Immunhistochemie	22
2.3. In-Situ-Tailing	24
2.4. DNA-Extraktion aus Blutproben	25
2.5. PCR	26
2.6. SSCP	27
2.7. DNA-Extraktion aus Polyacrylamidgelen	28
2.8. Sequenzierung	29
2.9. Bezugsquellen der Reagentien	32
2.10. Tabellen	34
3. Ergebnisse	
3.1. Immunhistochemische Detektion von p53 in MS-Läsionen	35
3.2. Ergebnisse des SSCP	37
3.3. Ergebnisse der Sequenzierung	40
3.4. Korrelation von Verlaufsformen der MS und p53-Polymorphismen	42
3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	42

4.	Diskussion	
4.1.	Die Expression von p53 in Oligodendrozyten bei Multipler Sklerose	43
4.2.	p53-induzierter Zelltod in Tumor- und Autoimmunerkrankungen	43
4.3.	Mögliche Bedeutung der veränderten Expression von p53 in der MS	44
4.4.	Bedeutung von Polymorphismen im p53 Gen für die MS	44
4.5.	Korrelation der histopathologischen Subtypen mit p53-Expression	45
5.	Zusammenfassung	47

Anhang

Literatur 48

Lebenslauf	65
Danksagung	

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

1.1.1. Definition der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Krankheit des Zentralnervensystems (ZNS), die zu einer Zerstörung von Myelinscheiden und/oder Oligodendrozyten führt (Lassmann 1998; Prineas 1985). Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose mit seiner vielfältigen klinischen Symptomatik wurde zuerst von J.-M. Charcot 1868 (Charcot 1868) beschrieben. Es ist in seiner Morphologie gekennzeichnet durch plaqueartige Narben, die sowohl zeitlich als auch örtlich disseminiert in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark auftreten und aus entzündlichen Entmarkungsherden hervorgehen. Die MS ist mit einer Prävalenz von 0,1% (Sadovnick et al. 1988) eine der am häufigsten auftretenden neurologischen Erkrankungen junger Erwachsener nordeuropäischer Abstammung und die am häufigsten auftretende Demyelinisierungskrankheit überhaupt.

1.1.2. Epidemiologie

Epidemiologische Studien zeigen, dass einige Rassen und ethnische Gruppen gehäuft an MS erkranken, andere dagegen sehr selten. Besonders empfänglich scheinen Kaukasier skandinavischer und schottischer Abstammung zu sein (Hogancamp et al. 1997; Page et al. 1995; Poser 1994; Rothwell und Charlton 1998), während MS in der mongolischen Rasse und unter Japanern (Detels et al. 1977; Kuroiwa et al 1975), Chinesen (Hou und Zhang 1992), amerikanischen Indianern (Oger und Lai 1994), Eskimos, Schwarzafrikanern (Dean 1967; Ebers und Sadovnick 1994), Aborigines, norwegischen Lappen und ungarischen Zigeunern (Hogancamp et al. 1997) selten ist. Die Prävalenz nimmt vom Äquator aus in nördliche Richtung zu (Kurtzke 1995), ist allerdings bei den Orientalen etwa zehnmal seltener als bei Bevölkerungsgruppen nordeuropäischen und nordamerikanischen Ursprungs in vergleichbarer geographischer Lage. Einige Autoren stellen fest, dass die unterschiedliche geographische Verteilung nur den unterschiedlichen Anteil an Skandinaviern in der jeweiligen Bevölkerung widerspiegelt, und damit das Resultat der Einwanderung von Wikingern und der Migration von Nordeuropäern ist

(Compston 1990; Poser 1995). Auch die klinische Ausprägung ist regional verschieden. So tritt die MS in Ostasien häufiger als Neuromyelitis optica auf (Kuroiwa et al. 1975; Shibasaki et al. 1981).

1.1.3. Genetische Einflüsse

Studien an Zwillingspaaren und Familien, in denen die MS gehäuft auftrat, belegen, dass genetische Einflüsse an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. So besteht unter monozygotischen Zwillingen eine Konkordanzrate von 31%, verglichen mit 5% bei dizygotischen Zwillingen (Sadovnick et al. 1993). Für einen Verwandten ersten Grades wird das Risiko von Sadovnick et al. 1988 mit weniger als 5% angegeben; es ist allerdings im Vergleich zum Risiko der Normalbevölkerung immer noch 30-50fach erhöht.

Auf eine Assoziation mit der Krankheitsentstehung hin wurden verschiedene Gen-Loci wie HLA-, CD-3-Rezeptor-, Immunglobulin-, mitochondriale, Myelinprotein-, Integrin- und Zytokingene mit unterschiedlichen, z.T. widersprüchlichen Ergebnissen untersucht.

In mehreren Studien wurde eine Assoziation zwischen dem Risiko, an MS zu erkranken und den HLA Subtypen HLA-DR2, DQ6 (HLA-DRB1*1501, HLA-DQA1*0102, HLA-DQB1*0602) (Coraddu et al. 1998; Olerup und Hillert 1991; Chataway et al. 1998; Sawcer et al. 1997, Oksenberg et al. 2001) gefunden. HLA-DR3 und HLA-DR4 scheinen zumindest in der sardinischen Bevölkerung mit der Entstehung der Krankheit assoziiert zu sein (Marrosu et al. 1997). Für HLA-DR2 gilt, dass das relative Risiko an MS zu erkranken mit der Genfrequenz in der Gesamtpopulation korreliert (Lucchinetti et al. 2000a). Ferner gibt es widersprüchliche Hinweise auf eine Assoziation von HLA-Antigenen mit einem jüngeren Erkrankungsalter, dem Geschlecht, einem schwerem schubförmigen oder mildem Verlauf (Celius et al. 2000; Kira et al. 1996; Masterman et al. 2000; McDonnell et al. 1999; Olerup et al. 1989; Runmarker et al. 1994; Weinshenker et al. 1998). Andererseits gibt es auch Hinweise auf die Existenz von schützenden HLA-Polymorphismen. So konnten Pavelko et al. 2000 zeigen, dass transgene Mäuse, die das menschliche HLA-DQ6 und HLA-DQ8 exprimierten, weniger empfänglich für eine durch TMEV (Theiler's murine encephalomyelitis virus) ausgelöste Demyelinisierung waren. Sie entwickelten in diesem Zusammenhang auch weniger neurologische

Defizite als Artgenossen, denen diese Antigene fehlten. Beim Menschen scheint die Kombination aus den HLA-Antigenen HLA-DR1 und HLA-DR53 einen gewissen protektiven Effekt gegen die Erkrankung an MS zu haben (Luomala et al. 2001).

Im Verdacht für eine genetische Prädisposition verantwortlich zu sein, stehen auch die Gene, die für die α -und β -Kette des CD-3 Rezeptors von T-Lymphozyten kodieren. Die bisher zur Verfügung stehenden Studien lassen jedoch keine eindeutigen Schlüsse zu, da sie nicht zu einheitlichen Ergebnissen kommen (Compston 1998).

Die bisher vorhandenen Daten zum Einfluß der VH-Region auf Chromosom 14q, die für die schweren Ketten der Immunglobuline kodiert, sind ebenfalls zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend, um eine Aussage hinsichtlich Ihrer Beteiligung an der Pathogenese zu treffen (Compston 1998).

Nach bisherigen Erkenntnissen ist auch ein Einfluß mitochondrialer Gene nicht wahrscheinlich, wenngleich auch hier ein Großteil dieser noch nicht erforscht ist (Compston 1998).

Auch für eine Beteiligung der Myelinproteine MAG, MOG und MBP gibt es zur Zeit noch widersprüchliche Erkenntnisse (He et al. 1998a,b; Tienari et al. 1998).

Für ICAM-1 konnten Mycko et al. erstmals 1998 eine Assoziation zwischen Polymorphismen im ICAM-1 Gen und Multipler Sklerose nachweisen.

Die Zytokingene IFN- γ , TGF- β 2 und IL-4 werden von einigen Autoren als Einflußfaktor verdächtigt, aber auch hier ist weitere Abklärung vonnöten (He et al. 1998a; Vandenbroeck et al. 1998).

1.1.4. Klinische Symptomatik und Diagnostik

Die Symptome der MS sind von Fall zu Fall sehr verschieden und variieren auch in ihrem zeitlichen Verlauf, gehen aber im Allgemeinen auf die Abschnitte des ZNS zurück, die am schwersten von der Demyelinisierung betroffen sind. Die einzelnen Symptome sind dabei keinesfalls spezifisch für die MS, erst die Kombination mehrerer ermöglicht die klinische Diagnosestellung nach den Poser-Kriterien (Poser et al. 1983). Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 31 Jahre. Der Krankheitsverlauf ist jedoch sehr variabel und reicht von sehr schweren Verläufen mit Tod innerhalb eines Jahres (Typ Marburg) bis zu milden Verläufen mit einer sehr

geringen Symptomatik auch nach bis zu 50 Jahren Krankheitsdauer. Auch die Frequenz der Schübe variiert erheblich, wird jedoch von Ebers 1998 mit durchschnittlich 0,8-1,0 pro Jahr angegeben (McDonald und Ron 1999). Zu den im einzelnen auftretenden Symptomen zählen Visusminderung, Doppelbilder, spastische Paresen, Ataxien, Parästhesien, Müdigkeit, Dysarthrie, Aphasie, Blasenentleerungsstörungen, Schmerzen, Demenz, Persönlichkeitsveränderungen, Epilepsie, und Schlaf- und Sexualstörungen. Die einzelnen Symptome nehmen in der Regel über einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen stetig zu. Nach einigen Wochen beginnt sich die Symptomatik zu bessern und erreicht zumindest zu Beginn einer MS nach zwei bis drei Monaten häufig eine scheinbar vollständige Erholung. Die mittlere Krankheitsdauer beträgt laut Bronnum-Hansen et al. 1994 für Männer 28, für Frauen 33 Jahre, wobei die meisten Patienten an Sekundärkomplikationen versterben, jedoch nur wenige Patienten an MS selbst (McDonald und Ron 1999).

Als Diagnoseverfahren stehen neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung verschiedene Untersuchungsmethoden wie evozierte Potentiale (VEP, SEP, AEP, MEP) (Halliday et al. 1972; Cowan et al. 1984), die Magnetresonanztomographie (MRT) (Ormerod et al. 1987) und die Liquoruntersuchung zur Verfügung (Andersson et al. 1994). Ein Gadolinium-Enhancement, hypo- oder hyperintense Läsionen im MRT, verminderte Nervenleitgeschwindigkeiten und der Nachweis einer erhöhten Zellzahl und Proteinkonzentration sowie oligoklonaler IgG-Antikörper im Liquor sind wichtige paraklinische Befunde der Erkrankung. Keiner dieser Befunde ist jedoch für sich allein spezifisch, erst das Gesamtbild erlaubt die sichere Diagnose. Falls andere Differentialdiagnosen in Betracht gezogen bzw. ausgeschlossen werden müssen, kann als ultima ratio die Biopsie zur Sicherung des Befundes herangezogen werden. International anerkannt ist die Einteilung der Fälle in gesicherte und wahrscheinliche MS, die anhand der Poser-Kriterien vorgenommen wird (Poser et al. 1983; Poser et al. 2001). Diese werden neuerdings aber seitens des International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis nicht mehr empfohlen. Dessen neue Kriterien sollen die Diagnosestellung auch bei zunächst unklar erscheinenden Befunden und Verläufen erleichtern bzw. früher ermöglichen (McDonald et al. 2001).

1.1.5. Verlaufsformen

Das Krankheitsbild der MS umfaßt verschiedene Verlaufsformen. Im einzelnen unterscheidet man schubförmig-remittierende (RR-MS), primär und sekundär chronisch-progrediente (PP-MS, SP-MS), benigne (klinisch stumme) und maligne Verläufe (Marburg-Variante). Als Schub bezeichnet man das erstmalige oder wiederholte Auftreten von Symptomen, die mindestens über einen Zeitraum von 24 Stunden anhalten. Der klinische Verlauf der schubförmig-remittierenden MS ist zu Beginn der Erkrankung gekennzeichnet durch eine partielle oder vollständige Rückbildung der Krankheitszeichen nach den einzelnen Schüben, die typischerweise im dritten und vierten Lebensjahrzehnt zum ersten Mal auftreten und das weibliche Geschlecht ungefähr zweimal häufiger betreffen (Noseworthy et al. 2000b). Bei der primär chronisch-progredienten Form lassen sich keine einzelnen Schübe voneinander abgrenzen, bzw. es kommt nur zu einer geringgradigen Rückbildung der neurologischen Symptomatik, die sich in einem schleichenden Prozeß zusehends verschlimmert. Eine unterschiedliche Inzidenz zwischen Frauen und Männern fehlt hier (Noseworthy et al. 2000b). Die schubförmig-remittierende Verlaufsform der MS kann in der Mehrzahl der Fälle (ca. 66%) im weiteren Verlauf der Erkrankung in eine sekundär-progrediente Form übergehen (Lublin und Reingold 1996).

Die sogen. benigne MS zeichnet sich durch einen sehr gutartigen Verlauf aus, bei dem auch viele Jahre nach Krankheitsbeginn im Wesentlichen noch alle neurologischen Funktionen intakt geblieben sind. Diese Form wird auch als klinisch stumme MS gelegentlich im Rahmen einer Autopsie diagnostiziert (Mews et al. 1998). Die maligne MS vom Marburg-Typ ist dagegen durch einen sehr rasch fortschreitenden Krankheitsprozeß charakterisiert, der innerhalb kürzester Zeit zum Tode führt.

Zusätzlich unterscheidet man einige Sonderformen von der „klassischen“ MS. Die Neuromyelitis optica (Typ Dévic) zeichnet sich durch rezidivierende Opticusneuritiden in Kombination mit einer Myelitis transversa aus. Die Diagnose „Typ Balo“ (konzentrische Sklerose) läßt sich nur anhand der charakteristischen histopathologischen Veränderungen, die aus abwechselnden Schichten von demyelinisierten und remyelinisierten Nervenfasern bestehen, stellen (Karaarsalan et al. 2001). Der Typ Schilder mit dem klinischen Bild einer Leukenzephalopathie mit Demenz, Psychose, Pyramidenbahnläsionen und Sehstörungen, die stetig

progredient fortschreitet, zeichnet sich durch eine nicht plaqueartige Form der Demyelinisierung aus (Garell et al. 1998).

Die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) tritt als monophasische Erkrankung nach vorausgegangener Impfung oder Infektion auf (Lucchinetti et al. 1998).

1.1.6. Therapie der MS

Obwohl verschiedene Therapieansätze existieren, gibt es bis heute keine Behandlung, die in der Lage wäre, die Multiple Sklerose zu heilen. Im akuten Schub ist die hochdosierte Gabe von Kortikosteroiden das Mittel der Wahl. Anschließend sollte frühzeitig eine prophylaktische immunmodulatorische Monotherapie begonnen werden. In verschiedenen großen klinisch-kontrollierten Doppelblind-Studien konnte IFN- β 1a/b die Schwere und Anzahl der Schübe reduzieren sowie die Zeitspanne bis zu einer weiteren klinischen Verschlechterung verlängern. Auch der Anstieg der Läsionsfläche im MRT war unter IFN- β Therapie im Vergleich mit der Placebo-Gruppe geringer (MKSTG 1999; MKSTG 2001; Hohlfeld 1999). Die subkutane Gabe von Copolymer-1 (Glatirameracetat), einem synthetischen Polypeptid aus den Aminosäuren Alanin, Glutamin, Lysin und Tyrosin, führte in mehreren Studien zu einer statistisch signifikant verminderten Schubrate und einer Verminderung der subklinischen Krankheitsaktivität (Comi et al. 2001; He et al. 2000; Hohlfeld 1999). In Fällen von Therapieresistenz kann eine Mehrfach- oder Kombinationstherapie mit Azathioprin, Mitoxantron oder Cyclophosphamid erwogen werden (MKSTG, 1999; MKSTG, 2001). Neben diesen etablierten Therapieverfahren besteht die Möglichkeit einer Behandlung mit i.v.-Immunglobulinen und Plasmapherese, die in kleineren oder mittleren Studien Erfolge gezeigt hat (Strasser-Fuchs et al. 2000; Weinshenker 2001). Immunglobuline sind allerdings nicht in der Lage, eine bereits länger bestehende Muskelschwäche zu bessern (Noseworthy et al. 2000a). Zusätzlich zur medikamentösen Behandlung werden die Patienten einer unterstützenden symptomatischen Therapie zugeführt, die Physiotherapie, Ergotherapie, logopädische Therapie und psychologische Betreuung umfassen kann und soll.

1.2. Histopathologie

1.2.1. MS-Plaques

Der Entstehungsort für MS-Läsionen scheint dem Zufall zu unterliegen, wenn auch einige Regionen wie der N. opticus, die paraventriculäre weiße Substanz, Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark gehäuft betroffen sind. In den für die Krankheit charakteristischen Plaques findet sich eine Zerstörung von Myelinscheiden und/oder Oligodendrozyten sowie Zeichen einer Entzündungsreaktion (Lassmann 1998; Prineas 1985). Die Läsionen finden sich oft im Umkreis von einem oder mehreren mittelgroßen Blutgefäßen. Die zumeist rundlich-ovalen Plaques haben oft fingerartige Ausläufer, die sich entlang dieser Gefäße erstrecken (Dawson-Finger). Entzündungszellen befinden sich typischerweise perivaskulär, können allerdings das Parenchym auch diffus infiltrieren. Ihre Zusammensetzung ist stets abhängig von Stadium und Aktivität der Demyelinisierung. Mit Hilfe verschiedener immunhistochemischer und molekularbiologischer Marker und Methoden können nach Lucchinetti et al. 2000 vier verschiedene Subtypen unterschieden werden, denen eine unterschiedlich ausgeprägte Infiltration mit T-Zellen und Makrophagen sowie der variable Erhalt von Axonen und die Ausbildung einer astrozytären Narbe gemein ist. Völlig unterschiedlich jedoch sind in den jeweils typischen Plaques Grad und Art der Schädigung von Myelinscheiden und Oligodendrozyten sowie die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats (Lucchinetti et al. 1996). Teilweise findet sich eine Rekrutierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen (Scolding et al. 1998; Prineas et al. 1993). Die histopathologische Heterogenität der Plaques weist möglicherweise auf eine unterschiedliche Ätiologie der Krankheit sowie auf jeweils verschiedene zur Demyelinisierung führende Pathomechanismen hin (Lucchinetti et al. 2000).

1.2.2. Oligodendrozytenpathologie der MS

Das histopathologische Muster der Oligodendrozytenpathologie der MS ist von Fall zu Fall unterschiedlich (Brück et al. 1994; Brück et al. 1995; Ozawa et al. 1994), die Läsionen eines Patienten weisen jedoch immer das gleiche Muster auf. Lucchinetti et al. 1999 definieren zwei verschiedene Hauptformen der Oligodendrozytenpathologie. Im ersten Typ sind die Oligodendrozyten erhalten bzw. kommt es zu einer

Rekrutierung von Vorläuferzellen (Gruppe I). In Gruppe-II-Läsionen findet sich dagegen eine deutlich reduzierte Anzahl von Oligodendrozyten. Gruppe-I-Läsionen betreffen ca. 70 % der MS-Fälle, Gruppe-II-Läsionen ca. 30 %. Die Plaques aus Gruppe I weisen - im Gegensatz zu Gruppe-II-Plaques - häufig remyelinisierte Areale auf. In der gleichen Studie fand sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Verlust von Oligodendrozyten und der Dichte der Makrophageninfiltration.

1.2.3. Immunpathologie der MS

In verschiedenen tierexperimentellen Studien, In-Vitro-Versuchen und histopathologischen Studien zeigte sich, dass eine Zerstörung von Myelinscheiden und/oder Oligodendrozyten durch unterschiedliche Auslöser verursacht werden kann. Mit der Experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) existiert bereits seit 1933 ein Tiermodell für entzündliche Demyelinisierungskrankheiten des Menschen (Rivers et al. 1933). Es konnte gezeigt werden, dass mit Myelinproteinen immunisierte T-Zellen die Blut-Hirnschranke überwinden und im Hirnparenchym eine Autoimmunreaktion auslösen können. Die Lokalisation der Läsionen und das Ausmaß der Entmarkungsreaktion und Demyelinisierung variiert dabei je nach verwendetem Antigen (MOG, MBP oder MAG) (Lassmann 1983; Berger et al. 1997). Allerdings schlugen zahlreiche am Modell der EAE geprüfte und erfolgreiche Therapieversuche bei der Behandlung von MS-Patienten fehl. Dies spricht dafür, dass an der Demyelinisierung in MS-Läsionen noch andere Faktoren wie zytotoxische T-Zellen, humorale Faktoren, Zytokine (TNF- α) (Burgmaier et al. 2000; Cammer 2000) und toxische Metabolite (Sauerstoffradikale, NO) (Griot et al. 1990; Juurink et al. 1998; Merrill et al. 1993) beteiligt sein müssen. Als infektiöse Ursachen der MS stehen verschiedene Viren sowie Chlamydien in Verdacht, mit der Krankheitsentstehung assoziiert zu sein (Hernan et al. 2001; Sriram et al. 1999).

Mit Hilfe immunhistochemischer und molekularbiologischer Methoden lassen sich vier verschiedene immunpathogenetische Subtypen klassifizieren. Zwei Subtypen (I und II) weisen große Ähnlichkeiten mit T-Zell- oder T-Zell/Antikörper-vermittelten autoimmunen EAEs der Maus und der Ratte auf. Die Subtypen III und IV zeigen einen primären Oligodendrozytenschaden. Vergleichbare Veränderungen finden sich bei viralen Enzephalitiden der Maus oder Ratte. Am häufigsten finden sich MS-

Läsionen vom Subtyp II (50%), gefolgt von Subtyp III (28%), I (17%) und IV (3%) (Lucchinetti et al. 2000).

1.3. Apoptose

1.3.1. Die Apoptosekaskade

Apoptose als programmierter Zelltod, der genetisch gesteuert ist und Energie verbraucht, ist sowohl an der Morphogenese von embryonalem Gewebe als auch an der Aufrechterhaltung der Homöostase von Organen und Geweben im Erwachsenen beteiligt. Durch Apoptose können Zellen, die ihre ursprüngliche Funktion verloren haben oder von Viren infiziert sind, eliminiert werden. Effektives Kernstück der Apoptose ist ein kaskadenartig aktivierbares System von Caspasen, welches Zytoskelett, Kernproteine und nukleäre Regulator- und Schutzproteine angreift und letztlich nach Ausschaltung des DNA-Reperaturmechanismus über eine Aktivierung von Endonukleasen die DNA fragmentieren kann (Abb. 1.1; Stadelmann und Lassmann 1999). Morphologische Kennzeichen der Apoptose sind Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins, Fragmentierung des Zellkerns und eine Ausschleusung membrangebundener Teile des Zellkerns („blebbing“). Apoptose kann auf folgende Art und Weise ausgelöst werden:

1. Durch die Bindung von Liganden an Rezeptoren (z.B. FasL an Fas; TNF- α an TNF-R1)
2. Durch zytolytische Mediatoren, die von zytotoxischen T-Zellen sezerniert werden (z.B. Perforin, Granzym B) und z.B. Caspase-3 aktivieren
3. Durch die Unterbrechung von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakten (z.B. zwischen Cadherinen oder Integrinen und Ihren Liganden)
4. Durch die Präsenz (z.B. TGF- β) oder Abwesenheit (z.B. CSF) von Wachstumsfaktoren
5. Durch ansteigende oder abfallende Hormonkonzentrationen (z.B. Steroidhormone)
6. Durch nichtphysiologische Stimuli (z.B. Bestrahlung oder „serum starvation“) (Huppertz et al. 1999).

Apoptose ist ein genau regulierter Prozess und kann in verschiedenen Stadien stimuliert und inhibiert werden:

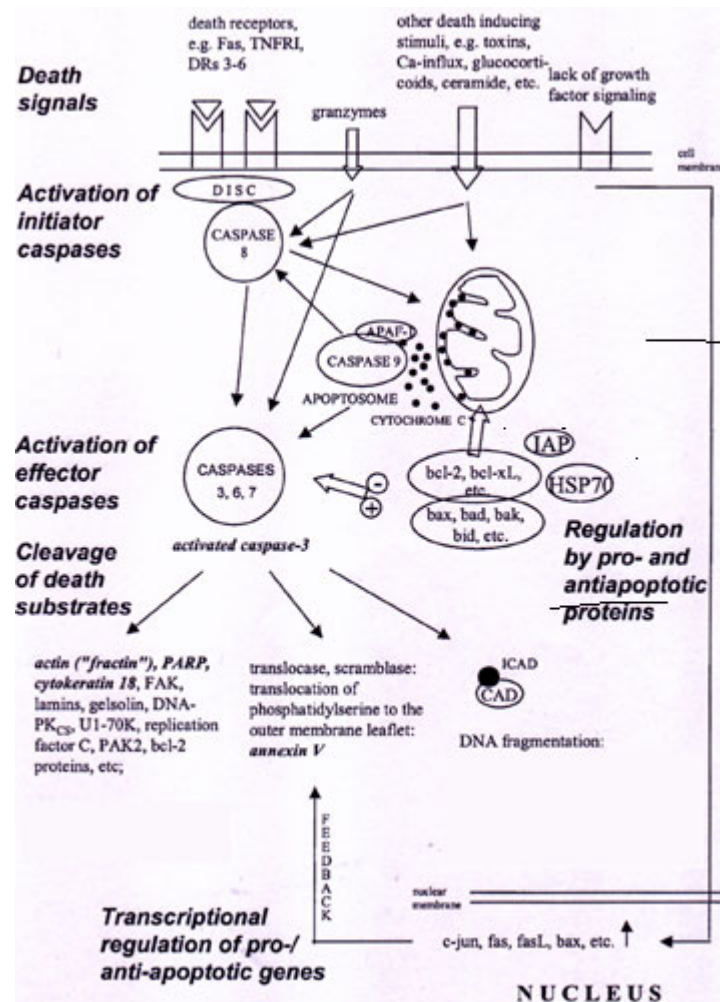


Abb.1.1: Apoptoseregulation schematisch: Im wesentlichen sind zwei Hauptwege der Apoptoseinduktion bekannt. Zum einen führt die Aktivierung von Caspasen via Todesrezeptoren über eine Serie von Protein-Protein-Interaktionen zum programmierten Zelltod. Zum anderen mündet die Freisetzung von Cytochrome C und APAF-1 über die Aktivierung von Caspase-9 in die Caspasenkaskade. Zwischen beiden Pfaden besteht ein intensiver Crosstalk.

Nach Bindung z.B. von $\text{TNF-}\alpha$ an TNF-R1 oder FasL an Fas führt die Aktivierung dieser Rezeptoren zur Bildung eines Signalkomplexes, der nachfolgend die Familie der sogen. Initiator-Caspasen (Caspase-2, 8, 9, 10) aktiviert (Fesus 1993; Fraser und Evan 1996). Diese Initiator-Caspasen steuern die ersten proteolytischen Schritte, wie den Abbau des Zytoskeletts, und sollen zum charakteristischen „blebbing“ der Zelloberfläche führen (McCarthy et al. 1997). Durch den Abbau der Flippase bzw. die Aktivierung der Floppase kommt es zu einem Umklappen von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran (Martin et al. 1995). Die Initiator-Caspasen spalten und aktivieren außerdem die sogenannten Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 und leiten

so den irreversiblen Teil der Kaskade ein (Mignotte und Vayssiere 1998). Ihre Aktivierung (bad, bak, bax, bcl-x_S, bik, hrk) oder Inaktivierung (A1, bcl-2, bcl-w, bcl-x_L, bfl-1, brag-1, mcl-1, NR13) wird durch die Familie der mitochondrialen bcl-2 Proteine gesteuert (Hockenberry et al. 1990; Renvoize et al. 1997, Mignotte und Vayssiere 1998). Sind die Effektor-Caspasen aktiviert, so bauen sie entweder direkt oder durch Aktivierung anderer Proteasen eine große Anzahl von Proteinen ab, die für das Überleben der Zelle notwendig sind. Hierzu zählen z.B. Proteine der Intermediärfilamente, Kernmembranproteine, DNA-Synthese- und Reparaturproteine, Topoisomerase II_α und die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Kinase (Caulin et al. 1997; Greidinger et al. 1996; Tewari et al. 1995; Nakajima et al. 1996; Song et al. 1996). Zusätzlich werden auch verschiedene Endonukleasen aktiviert, die eine Fragmentierung der DNA bewirken (Liu et al. 1997). Zusammengefaßt kommt es im Rahmen der letzten Schritte der Apoptose zur Herunterregulierung der Transkription, zur Kondensation und Fragmentierung der DNA, zur Stabilisierung der Plasmamembran und zur Ausbildung der Apoptosekörperchen (Kerr et al. 1995).

1.3.2. Apoptose von T-Zellen in MS und EAE

Durch das Tiermodell der EAE ist bekannt, dass Apoptose einer der Mechanismen ist, durch den T-Zellen im Falle einer durch sie vermittelten Entzündungsreaktion wirkungsvoll aus dem Hirnparenchym eliminiert werden können (Gold et al. 1997). Für ein ähnliches Phänomen beim Menschen gibt es bislang nur wenige Daten, jedoch konnten Bauer et al. 1999 in einem Fall von akuter disseminierter Enzephalomyelitis (ADEM), die histomorphologisch der EAE ähnelt, zeigen, dass bis zu 30% der im Hirnparenchym gefundenen T-Lymphozyten apoptotisch waren. Pender 1998 postuliert aufgrund von Beobachtungen in der EAE, dass die MS die Folge einer gestörten Apoptose von autoreaktiven T-Zellen sein könnte. Diese lassen sich auch im Blut gesunder Menschen nachweisen (Pette et al. 1990). Im Falle des Überlebens und einer ZNS-Invasion dieser T-Zellen könnte es durch Sekretion von Zytokinen und Rekrutierung von Makrophagen oder durch die autoreaktiven T-Zellen direkt zum Untergang von Oligodendrozyten kommen. Ursache einer verminderten Apoptose könnte zum einen eine erhöhte costimulatorische Aktivität bzw. eine verminderte Expression des Fas-Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen sein.

Zum anderen könnte möglicherweise eine Störung des proapoptotischen Pfads im Sinne einer verminderten Aktivierung oder vice versa eine vermehrte Expression antiapoptotischer Proteine aus der Bcl-2-Familie ursächlich für die reduzierte Apoptose von T-Zellen sein. Mittels dieser Hypothese könnten auch die unterschiedlichen Verlaufsformen erklärt werden. Demnach seien im Falle der schubförmig-remittierenden MS autoreaktive T-Zellen gegen Myelinproteine, bei der primär-progredienten MS dagegen T-Zellen gegen axonale Antigene für die Entstehung der Krankheit verantwortlich. Für eine Störung der T-Zellapoptose als Krankheitsursache sprechen auch Experimente von Zipp et al. 1998, in denen gezeigt wurde, dass die Apoptose in LN-18 Gliom-Zellen durch Serum von MS-Patienten mit erhöhten Spiegeln von löslichem CD95 (Fas) inhibiert werden konnte (Zipp et al. 1998). Auch eine Apoptoseresistenz von PLP-spezifischen T-Zellen aus Patienten mit chronisch-progressiver MS bei Gabe von Glucocorticoiden könnte eine Bestätigung für die Hypothese von Pender sein (Correale et. al. 2000).

1.3.3. Apoptose und Oligodendrozyten

Oligodendrozyten können sowohl durch Nekrose als auch durch Apoptose in MS-Läsionen eliminiert werden (Lucchinetti et al. 1996; Bonetti und Raine 1994). Es liegen hierzu verschiedene Untersuchungen in vitro und an Tiermodellen sowie an MS-Läsionen des Menschen vor.

Es ist bekannt, dass TNF- α und Lymphotoxin (LT) in vitro in Oligodendrozyten aus Kühen Apoptose auslösen können (Selmaj et al. 1991). Experimentell gilt es als gesichert, dass bei Apoptoseinduktion mittels TNF- α in vitro p53 induziert wird und dass eine Überexpression von p53 in Oligodendrozyten zu Apoptose führen kann (Ladiwala et al. 1999). Umgekehrt war die experimentelle Inhibition von Apoptose in vitro durch den Komplement-Komplex C5b-9 von einer Hemmung der Caspase-3 Aktivierung sowie von einer erhöhten bcl-2 Synthese begleitet. In diesem Zusammenhang konnte außerdem gezeigt werden, dass C5b-9 auch die TNF- α -vermittelte Apoptose in vitro hemmt (Soane et al. 1999). Ebenfalls protektiv wirkt das Zytokin CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) bei Oligodendrozyten gegen Apoptose in vitro (D'Souza et al. 1996).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die lokale Produktion von TNF- α durch Gliazellen des ZNS auch bei intakter Blut-Hirn-Schranke und ohne die Präsenz von

Zellen des Immunsystems in transgenen Mäusen zur Apoptose von Oligodendrozyten und zur Vakuolisierung von Myelin führen kann. Nachfolgend kam es zu einer Rekrutierung von Makrophagen, einer Störung der Blut-Hirn-Schranke, dem Untergang von Oligodendrozyten und der Zerstörung von Axonen. Es entwickelte sich das Bild eines akuten oder chronischen MS-Plaques (Akassoglou et al. 1998). Ebenfalls kann es in Abwesenheit von reifen B- und T-Zellen nur durch TNF- α in transgenen Mäusen zu einer Demyelinisierung oder der Entwicklung von neurologischen Defiziten kommen (Kassiotis et al. 1999). Wird in Mäusen Demyelinisierung und Apoptose von Oligodendrozyten experimentell durch Cuprizone ausgelöst, so können kurze Zeit später eingewanderte Oligodendrozytenvorläuferzellen und darauffolgend reife Oligodendrozyten nachgewiesen werden, die IGF-1 exprimierten (Mason et al. 2000).

Ebenso wie das histopathologische Muster der MS beim Menschen, das in verschiedenen Verlaufsformen und Patienten sehr unterschiedlich ist, so variiert auch der Grad der Präsenz von Oligodendrozyten und deren Vorläufern innerhalb der Demyelinisierungsherde (Lucchinetti et al. 2000b). Die Frage warum es in einem Teil der Fälle zu einem Untergang, in einem anderen Teil dagegen zu einem Erhalt von Oligodendrozyten kommt, ist bislang nur in Ansätzen geklärt. Neben Zytokinen ist auch NO in der Lage, in Zellen Apoptose und vermehrte Expression von p53 auszulösen (Chung et al. 2001). p53 ist außerdem an der physiologischen Differenzierung und Apoptose von Neuronen und Oligodendrozyten beteiligt. (Casaccia-Bonnet 2000, Eizenberg et al. 1996). Weiterhin fanden Dowling et al. 1999 Hinweise, dass die Expression des dem TNF- α und Fas-Rezeptor ähnlichen Rezeptor p75^{NTR} in Oligodendrozyten in MS-Läsionen erhöht ist. D'Souza et al. 1996 konnten nachweisen, dass durch die Bindung von sogenannten M3-Antikörpern an den Fas-Rezeptor, dessen Expression sich im Vergleich zu gesundem Hirngewebe in aktiven und chronischen MS-Läsionen als erhöht erwies, Oligodendrozyten zumindest in vitro durch Lyse der Zellmembran untergehen können. Gegen Beteiligung von TNF- α am Untergang von Oligodendrozyten spricht, dass die Expression des TNF- α -Rezeptors in MS-Läsionen sowohl in Oligodendrozyten als auch in T-Zellen nachgewiesen werden konnte, aber nur die T-Zellen apoptotisch waren. Das könnte zugleich ein Hinweis darauf sein, dass andere Schädigungsmechanismen wie Zytolyse als Auslöser des Zelltodes in Frage kommen könnten (Raine et al. 1998).

Die Zahl der Oligodendrozyten, die das antipoptotische bcl-2 in vivo exprimieren, ist in aktiv demyelinisierten Läsionen im Vergleich zur periläsional gelegenen weißen Substanz erhöht und könnte somit für einen Erhalt von Oligodendrozyten sorgen. Außerdem gibt es in diesem Zusammenhang Hinweise, dass die Expression von bcl-2 mit einer Remyelinisierung assoziiert ist, am stärksten in Patienten mit schubförmiger MS (Kuhlmann et al. 1999).

1.4. p53

1.4.1. Struktur, Regulation und Funktion

p53 ist ein Protein aus der Familie der proapoptotischen Tumorsuppressorgene. Seine mutationsbedingte Inaktivierung findet sich in ungefähr der Hälfte aller Tumoren und gilt als eine der Ursachen für die Entstehung von Neoplasien. p53 bindet an spezifische DNA-Sequenzen und aktiviert dadurch die Transkription von verschiedenen Genen, die die erforderlichen Bindungsstellen in Form von vier Kopien der pentameren Sequenz PuPuPuC(A/T) enthalten. Die Sequenzen sind in entgegengesetzter Richtung angeordnet, mit einem Abstand von bis zu 13bp zwischen den Paaren. Die Struktur und die Bindung des p53-Proteins an die DNA-Sequenzen ist in den Abbildungen 1.2, 1.3, 1.4 wiedergegeben (Cho et al. 1994).

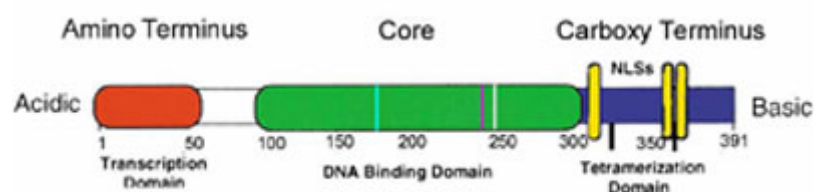


Abb. 1.2: Das p53-Protein kann in drei funktionelle Untereinheiten unterteilt werden. Das Aminoende (rot) ist entscheidend für die Funktion des Proteins als Transkriptionsfaktor. Grün dargestellt ist die DNA-bindende Domäne. Das Carboxylende sorgt für die Oligomerisation des Proteins. Zusätzlich sind die für die Lokalisation des Proteins in den Zellkern massgeblichen Sequenzen dargestellt (gelb)

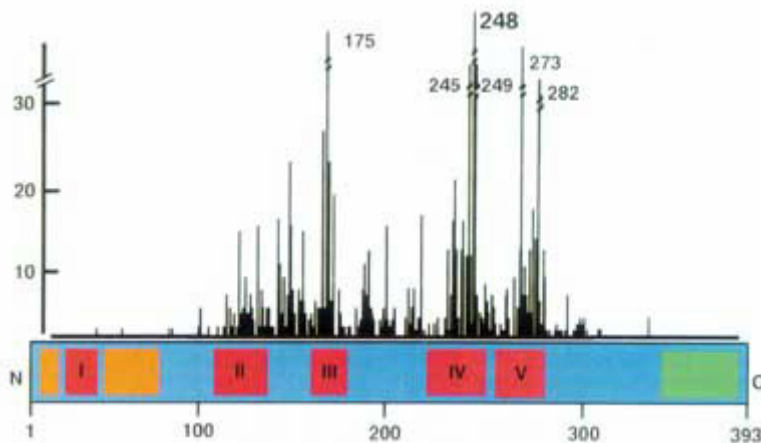


Abb. 1.3: Innerhalb der DNA-bindenden Domäne finden sich nahezu alle bekannten Mutationstellen im p53-Gen. Dargestellt ist die Frequenz der Mutationen für einzelne Codons. Mit römischen Ziffern markiert sind die hochkonservierten Anteile des Proteins.

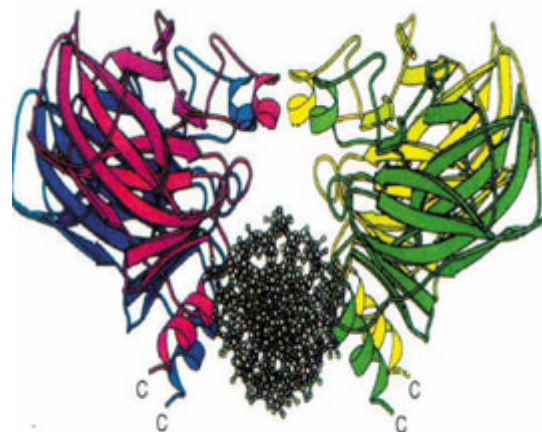
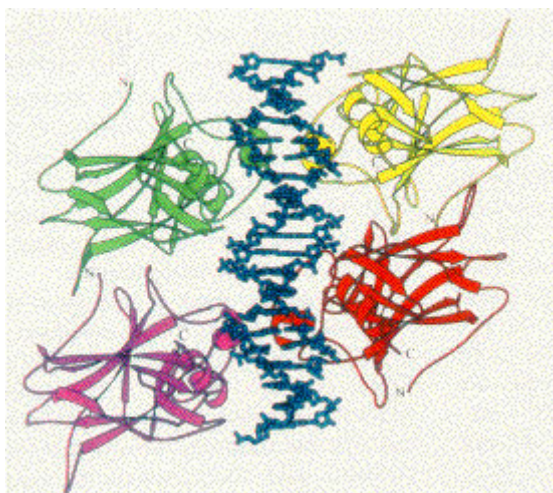


Abb. 1.4 und 1.5: p53 gebunden an DNA. In vivo existiert p53 als Tetramer. In vitro ist eine DNA-Bindung auch ohne eine Oligomerisation beschrieben und einzelne Anteile der zentralen Region können mit etwa einem Fünftel der Affinität des intakten Proteins an DNA binden. In der Zelle ist die Tetramerisation jedoch unabdingbar für die adäquate Funktion von p53. Die rechte Abbildung zeigt den Blick von der Seite, die linke vom Ende der DNA-Helix aus.

Die Transkription des p53-Gens wird durch verschiedene Arten von Stress aktiviert, wie z.B. DNA-Schäden, Telomer-Abbau, Onkogenaktivierung, Hypoxie und den Verlust von normalen Wachstumssignalen (Ryan et al. 2001). Die Aktivierung von p53 kann sowohl Differenzierung, Alterung, DNA-Reparatur und Inhibition der Angiogenese als auch Anhalten des Zellzyklus und Apoptose auslösen (Bates und Vousden 1999). p53 fungiert dabei als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor und bewirkt die Aktivierung oder Inhibition der Transkription verschiedener Gene. Im Rahmen der p53-induzierten Apoptose sind verschiedene Proteine bekannt, deren Expression durch p53 induziert wird, und die nachfolgend sowohl über den

mitochondrialen als auch über den Todes-Rezeptor-Weg Apoptose auslösen können (Vousden 2000). Mitochondriale Proteine, deren Transkription von p53 induziert wird, sind z.B. Bax, NOXA, PUMA und p53AIP1. Sie triggern die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung des Apaf-1/Caspase-9 Apoptosom-Komplexes (Miyashita und Reed 1995; Oda et al. 2000a; Nakano und Vousden 2001; Yu et al. 2001; Oda et al. 2000b). Auch die Todes-Rezeptor-Proteine Fas und Killer/DR5 sowie das Protein PIDD, das die sogen. Todesdomäne enthält, werden von p53 induziert (Lin et al. 2000).

Kontrolliert wird die Funktion von p53 durch Regulation seiner Transkription, Translation, Proteinstabilität, Lokalisation und Aktivität (Abb. 1.6 und 1.7). Als wichtigster Kontrolleur fungiert das Protein MDM2, das die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor vermindern und dessen Abbau beschleunigen kann. Die Transkription von MDM2 wird von p53 im Sinne eines positiven Feedback gesteuert. Die Induktion von p53 als Reaktion auf Zellstress inhibiert die Funktion von MDM2 auf verschiedenen Wegen (Woods und Vousden 2001). So wird die Interaktion von MDM2 im Falle eines DNA-Schadens durch die Kinasen Chk1 und Chk2 durch Phosphorylierung des aminoterminalen Anteils von p53 negativ beeinflusst und verhindert so seinen Abbau (Chehab et al. 2000, Shieh et al. 2000). Zusätzlich wird die Funktion und Aktivität von p53 durch seine Lokalisation im Zellkern, also durch

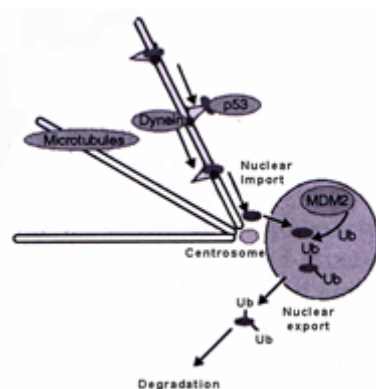


Abb. 1.6: Modell für Regulation der subzellulären Lokalisation von p53. Assoziation an Mikrotubuli dirigiert p53 in Richtung Zellkern mittels elektrostatischer Wechselwirkungen mit Dynein. Für den Import in den Zellkern sorgt die Bindung des Carboxylendes an Rezeptoren des Zellkerns. Der Export von p53 und MDM2 aus dem Zellkern wird vermutlich durch Ubiquitinierung vermittelt.

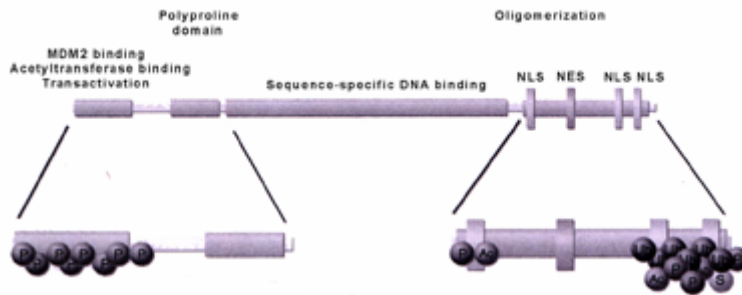


Abb. 1.7: Die für die Regulation der p53-Aktivität durch posttranslationale Modifikation durch Acetylierung (Ac), Phosphorylierung (P), Sumoylierung (S) und Ubiquitinierung (Ub) massgeblichen Bindungsstellen sind hier wiedergegeben.

seinen Im- und Export in bzw. aus demselben beeinflusst (Vousden und Vande Woude 2000). Auch andere posttranslationale Modifizierungen wie Acetylierung und die Bindung an das ubiquitinähnliche SUMO-1-Protein steuern die Aktivität von p53 (Gostissa et al. 1999; Rodriguez et al. 1999; Gu und Roeder 1997).

1.5. Aufgabenstellung

In den histopathologischen Mustern III und IV nach Lucchinetti 2000b ist die Anzahl der Oligodendrozyten in MS-Läsionen deutlich reduziert. Zugleich findet man in diesen Subtypen eine vermehrte Expression von p53. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob das vermehrte Vorkommen von Sequenzveränderungen im p53-Gen ursächlich für die vermehrte p53-Expression in Oligodendrozyten der MS-Plaques sein könnte. Dazu wurden DNA-Proben von MS-Patienten und gesunden Kontrollen mittels PCR-SSCP untersucht, verglichen und ggf. sequenziert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Untersucht wurden 11 Autopsien und 22 Biopsien von MS-Patienten aus den Jahren 1971 bis 1995, die aus dem neuropathologischen Institut der Universität Göttingen stammten, bzw. von Herrn PD Dr. M. Bergmann, Institut für klinische Neuropathologie des Zentralkrankenhauses Bremen-Ost, Herrn Prof. Dr. H. H. Goebel, Abt. Neuropathologie der Universität Mainz, Herrn Prof. Dr. F. Gullotta, Institut für Neuropathologie der Universität Münster, Herrn Prof. Dr. H. Lassmann, Institut für Neurologie der Universität Wien und Herrn Prof. Dr. U. Zettl, Nervenambulanz der Universität Rostock, zur Verfügung gestellt wurden. Die Entnahmen der Biopsien erfolgte aus den im MRT oder CT dargestellten Herden. Das Material wurde stereotaktisch oder im Rahmen einer offenen Biopsie (ein Fall) gewonnen, um damit Lymphome, Hirntumore oder eine Toxoplasmose bei klinisch/paraklinisch unklaren Fällen auszuschließen. Als Kontrollen dienten Gewebeproben von vier Feten und fünf Erwachsenen, die im Zeitraum von 1994 bis 1995 im Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen seziert wurden. Ferner wurden DNA-Proben von 100 gesunden Kontrollen, 107 MS-Patienten mit einem RR-Verlauf und 49 Patienten mit PP-Verlauf untersucht. Die DNA der Kontrollgruppe wurde aus Blutproben der Blutbank der Charité gewonnen, die DNA der MS-Patienten aus PBMCs (peripheral blood mononuclear cells). Die Proben der RR-MS-Patienten wurden von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Frauke Zipp aus der Neurologischen Klinik der Charité Berlin, die Proben von Patienten mit primär progredienter MS von Prof. Dr. Rieckmann aus der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg und Prof. Dr. Bein aus dem Institut für Immunologie der Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

2.2. Immunhistochemie

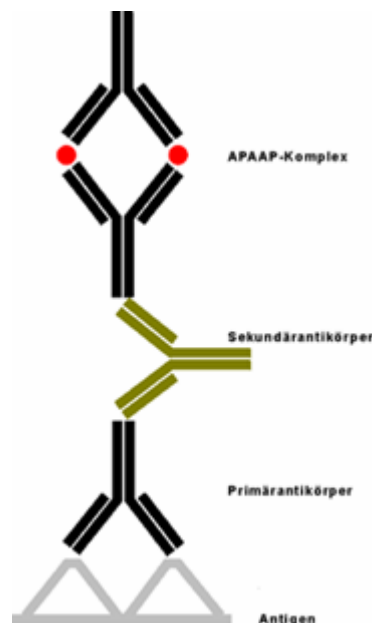
Durch immunhistochemische Verfahren können Antigene in histologischen Gewebepreparaten mit Hilfe von Antikörpern, Enzymen und Farbsubstraten nachgewiesen werden. Verschiedenste Proteine können durch eine Farbreaktion markiert und sichtbar gemacht werden. Für die vorliegende Arbeit wurden Primärantikörper gegen p53 (DAKO) und MOG (Myelin-Oligodendrozyten-

Glycoprotein, Dr. Piddlesden) eingesetzt. Mit der verwendeten APAAP (Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase)-Methode wird das zunächst farblose Farbsubstrat durch einen Enzym-anti-Enzym-Immunkomplex (bestehend aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem dagegen gerichteten Antikörper) umgesetzt, nachdem dieser über einen Sekundärantikörper (anti-mouse-Ig) an den Primärantikörper gebunden hat (Abb. 2.1). Dabei wird im einzelnen wie folgt vorgegangen:

1. Die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte werden mit Xylol entparaffiniert und mit Hilfe einer absteigenden Isopropylalkoholreihe rehydriert (3mal 100 %, 2mal 90 %, 70 %, 50 % und 30 % für jeweils 5 min).
2. Für den p53-Antikörper ist eine weitere Vorbehandlung nötig. Die Schnitte werden mit Zitronenpuffer (pH 6, bestehend aus Citronensäure-1-hydrat und HCl) für 3mal 5 min in der Mikrowelle gekocht.
3. Vor dem Auftragen des Primärantikörpers werden die Gewebeproben 20 Minuten mit Milchpulver (4 %) inkubiert, um unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden.
4. Der Primärantikörper gegen p53 wird im Verhältnis 1:40 mit BSA (0,1 %) verdünnt, auf die Proben pipettiert und für eine Stunde inkubiert. Genauso wird mit dem Sekundärantikörper (Anti-mouse-Ig) und dem APAAP-Komplex verfahren, zwischen den einzelnen Schritten wird mit PBS 3mal vorsichtig gespült, um ungebundene Immunkomplexe zu entfernen. Alle Inkubationen erfolgen bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Als Positivkontrolle dient lymphatisches Gewebe der menschlichen Tonsille, für die Negativkontrolle wird anstelle des Primärantikörpers 0,1 % BSA aufgetragen.
5. Nach der Inkubationsphase mit dem APAAP-Komplex werden die Schnitte mit dem Farbsubstrat (bestehend aus 50ml NBT/BCIP-Entwicklungspuffer, 225 µl NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate) und 175 µl BCIP (4-Nitro blue tetrazolium chloride) in 12, 144 g TRIS, 5,844 g NaCl, 10,165 g MgCl₂ und 1 l Aqua bidest.) für ca. 30-60 min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Sobald eine ausreichende Farbintensität erreicht ist, wird mit PBS gespült.
6. Vor der Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (anti-MOG) über Nacht wird erneut für 20 min mit Milchpulver (4 %) blockiert.

7. Nach dem zweiten Primärantikörper (anti-MOG) werden die Sekundärantikörper (anti-mouse-Ig, 1:40 in 0,1 % BSA) aufgetragen und für 60 min inkubiert, anschließend werden die Schnitte wiederum für 60 min mit dem APAAP-Immunkomplex inkubiert.
8. Als Farbsubstrat dient eine Lösung aus Levamisole (20 mg auf 35 ml Entwicklungspuffer und 12,5 ml Propandiol), Natriumnitrit (10mg auf 250 ml Aqua bidest. Und 100 µl Neofuchsin) und Naphtol-as-Biphosphat (14 mg auf 300µl Dimethylformamid), die mit 1 M Salzsäure auf pH 8,8 eingestellt wird.
9. Nach Entfernung der ungebundenen APAAP-Komplexe durch Spülen mit PBS-Waschpuffer werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für ca. 30 min unter ständiger Bewegung in der Küvette belassen. Sobald eine ausreichende Farbintensität erreicht ist, werden die Gewebeschnitte herausgenommen und mit Aqua bidest. gespült, um die Farbreaktion zu beenden, und mit Aquamont eingedeckt.

Abb. 2.1: Prinzip der APAAP-Methode



2.3. In Situ Tailing

Bei der Methode des In Situ Tailing handelt es sich um ein Verfahren, mit dem DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden können. Das Enzym Terminale Transferase katalysiert in einer Template-unabhängigen Reaktion die Verknüpfung von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) mit 3'Hydroxylenden von Einzel- oder

Doppelstrang-DNA-Molekülen unter Freisetzung von anorganischem Phosphat. Ein Teil der dNTPs ist mit dem Steroidhapten Digoxigenin markiert. Mit Hilfe eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers, der in einem späteren Schritt mit einem Farbsubstrat reagiert, können so bei apoptotischem Zelluntergang entstehende DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden:

1. Die Gewebeproben werden zunächst mit Proteinase K (50 bzw. $100\mu\text{g ml}^{-1}$) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit eiskaltem TBS 5 min gespült, um die Proteinase zu inaktivieren.
2. Auf die Gewebeproben wird dann der Tailingmix (bestehend aus $60\mu\text{l}$ Tailingpuffer, $12\mu\text{l}$ CoCl_2 , $3\mu\text{l}$ DIG-DNA, $1,5\mu\text{l}$ Terminale Transferase und $223,5\mu\text{l}$ Aqua bidest), der bei einem Volumen von $300\mu\text{l}$ für 4 Objekträger ausreicht, aufgetragen. Die Schnitte werden mit einem Deckgläschen bedeckt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen und für 60 min bei 37°C inkubiert.
3. Nach Spülung mit TBS und Abschwimmen der Deckgläschen wird mit 100% igem FCS (fetales Kälberserum) blockiert und der Anti-Digoxigenin-Antikörper ($1:250$ in 10% igem FCS verdünnt) aufgetragen und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Nach Spülung mit TBS werden die Objekträger für ca. $5-30$ min mit dem Chromogen NBT/BCIP lichtgeschützt inkubiert, bis eine ausreichende Farbreaktion erreicht ist.

2.4. DNA-Extraktion aus Blutproben

Die Extraktion der DNA aus heparinisiertem Vollblut bzw. PBMCs erfolgte nach dem QIAamp Blood Kit Protokoll der Firma QIAGEN:

1. Zu $200\mu\text{l}$ Vollblut bzw. Zellpellet werden $200\mu\text{l}$ PBS (Phosphate buffered saline) in ein $1,5\text{ml}$ Eppendorfgefäß gegeben
2. Zugabe von $25\mu\text{l}$ QIAGEN Proteinase K und $200\mu\text{l}$ Puffer AL und umgehendes Mischen des Ansatzes durch vortexen für 15sec .
3. Dieser Ansatz wird für 12 h bei 56°C inkubiert.
4. Zugabe von $200\mu\text{l}$ Ethanol ($96-100\%$) und erneutes Mischen
5. Plazieren einer QIAamp Zentrifugier-Säule in ein 2ml Sammelgefäß und

aufbringen der Lösung aus Schritt 4 auf die Säule. Nach Schließen des Deckels Zentrifugation bei 8000 min^{-1} für 1 min. Verwerfen des Sammelgefäßes samt Inhalt und Plazieren der Säule in sauberes 2ml-Sammelgefäß.

6. Nach vorsichtigem Öffnen der Säule Zugabe von $500 \mu\text{l}$ Waschpuffer AW erneutes Zentrifugieren bei 8000 min^{-1} für 1 min und Verwerfen des Eluats.
7. Nach Zugabe von $500 \mu\text{l}$ Puffer AW Zentrifugieren bei 13000 min^{-1} für 3 min.
8. Plazieren der Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß nach Verwerfen des 2ml Sammelgefäßes samt Inhalt.
9. Vorsichtiges Öffnen der QIAamp Säule und Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Puffer AE und Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur. Zentrifugation bei 8000 min^{-1} für 1 min.

2.5. PCR

Mit der Methode der PCR ist es möglich, gezielt bestimmte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Voraussetzung dafür ist zunächst die Kenntnis der Bereiche, die die Zielsequenz einrahmen. Komplementär zu diesen können dann Oligonukleotide als Forward- und Reverse-Primer konstruiert werden. Nach Zugabe einer geeigneten DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl_2 , eines Puffers sowie der Primer-Oligonukleotide (Tabelle 2.1) kann das gewünschte Fragment mit Hilfe eines Thermocyclers nach folgendem Schema bei variablen Zeiten und Temperaturen vervielfältigt werden:

1. Zunächst wird die doppelsträngige DNA initial 5 min bei 94°C denaturiert.
2. Im Rahmen des nun folgenden Zyklus wird nun nochmals bei 94°C für 1 min denaturiert, um den Primern und der DNA-Polymerase die Anlagerung an die Einzelstränge zu ermöglichen.
3. Bei einer Temperatur zwischen 50°C - 70°C gibt man den Primern für die Dauer von 45 sec die Möglichkeit, sich an die Einzelstränge anzulagern.
4. Die Synthese des jeweils komplementären Stranges erfolgt bei 72°C für 1 min.
5. Nach Ende des Zyklus, der 25-35 mal wiederholt wird, gibt man der DNA-Polymerase bei 72°C 10 min lang die Möglichkeit, begonnene Stränge zu Ende zu synthetisieren.

Die Annealing-Temperatur in Schritt 3 mußte für jeden Primer individuell festgelegt werden und ist aus Tabelle 2.2. ersichtlich. Um Erfolg und Reinheit der jeweiligen PCR zu überprüfen, erfolgt eine Agarosegelelektrophorese.

2.6. SSCP

Mit Hilfe der SSCP–Analyse ist es möglich, Polymorphismen und Mutationen in DNA-Einzelsträngen schnell und einfach nachzuweisen. Dabei macht man es sich zu Nutze, dass die Einzelstränge unter nicht denaturierenden Gelbedingungen nicht linear, sondern durch intramolekulare Basenpaarungen in gefaltetem Zustand vorliegen. Bereits ein Basenaustausch pro Strang reicht dabei für ein unterschiedliches Laufverhalten aus. Die Spezifität soll bei Fragmenten mit einer Länge von 200 bp annähernd 100 % betragen (Sarkar et al. 1992). Laufzeit, Leistung Vernetzung und Acrylamidkonzentration müssen für verschiedene DNA-Abschnitte jeweils einzeln optimiert werden (Tabelle 2.3). Um die Auftrennung der Einzelstränge zu verbessern kann Glycerin beigemischt werden.

Die Zubereitung der Polyacrylamidgele erfolgte folgendermaßen:

1. Säuberung der Glasplatten mit Alconox-Spülmittel und Ethanol (100 %).
2. Aufbringen und sorgfältiges Verreiben einer Silan-Chloroform-Lösung (5 %).
3. Nach Einlegen eines Spacers Fixierung der beiden Glasplatten mit Klammern.
4. Zwischen die beiden Glasplatten wird nun die vorbereitete Mischung aus Acrylamid, 2,2'Bisacrylamid, TBE (1 %ig, bestehend aus Trizma, Borsäure und EDTA) und Aqua bidest. gegossen. Zur Einleitung der Polymerisationsreaktion werden als Starter vorher 400 µl APS (Ammoniumpersulfat) und 40 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine) zugegeben.
5. Nach Applikation des flüssigen Polyacrylamidgels Einlegen eines 40fachen Zahn Kammes.
6. Die Polymerisation erfolgt bei Raumtemperatur für 60 min.
7. Nach Entfernung der Klammern und Ziehen des Kammes können die Glasplatten in die Elektrophoresekammer gestellt werden und die Proben in die Taschen pipettiert werden.

Nach Abschluß der Elektrophorese werden die DNA-Banden mit Hilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht und die Gele nach Aufziehen auf Papier für zwei Stunden bei 80°C vakuumgetrocknet.

Die Silberfärbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Fixieren der DNA im Gel mit 10%iger Ethanollösung für 10 min.
2. Einstellung eines sauren pH-Wertes mit 1 %iger Salpetersäure für 30 sec
3. Einmaliges Spülen mit Aqua bidest.
4. Färbung (Ag-Anlagerung an DNA) mit 0,2 %iger Silbernitratlösung über 20 min
5. Dreimaliges Spülen mit Aqua bidest.
6. Entwicklung (Fällung des metallischen Silbers) mit 3 %iger NaCO-Lösung bis die Banden sichtbar werden.
7. Stoppen der Färbereaktion mit 10 %iger Essigsäure bis sich Blasen unter dem Gel bilden.
8. Trocknen auf dem Gelrockner für ca. 2 Stunden.

2.7. DNA-Extraktion aus Polyacrylamidgelen

Die Extraktion von DNA-Banden aus einem Polyacrylamidgel ist notwendig, um den vermuteten Polymorphismus bzw. die Mutation in DNA-Strängen später mit Hilfe einer Sequenzierung nachweisen zu können. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der jeweilige Einzelstrang nun in nahezu reiner Form ohne größere Verunreinigung mit der vorher vorhandenen genomischen DNA vorliegt.

Die Isolierung und Aufreinigung geschieht mit Hilfe des QIAGEN Purification Kits wie folgt:

1. Möglichst exaktes Ausschneiden der Banden und Einbringen in je ein vorher beschriftetes 500 µl Eppendorfgefäß mit einem sterilen Skalpell.
2. Zugabe von 100 µl Diffusionspuffer bestehend aus jeweils 25 µl Ammoniumacetat (0,5 M), Magnesiumacetat (10 mM), EDTA (1 mM, pH 8) und SDS (0,1 %, Sodiumdodecylsulfate).
3. Inkubation bei 50°C für 30 min im Thermomixer.

4. Zentrifugieren des Ansatzes bei 13000 min^{-1} für 1 min.
5. Zugabe von $300 \mu\text{l}$ Puffer QG als pH-Indikator.
6. Aufbringen des Ansatzes ohne die Gelbande auf QIAGEN Zentrifugiersäule, Hineinstellen in 2 ml Sammelgefäß und Zentrifugieren bei 13000 min^{-1} 1 min. Verwerfen des Filtrats.
7. Waschen der DNA durch Zugabe von $750 \mu\text{l}$ Puffer PE (bestehend aus 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl in Ethanol) und zweimaliges Zentrifugieren unter zwischenzeitlichem Verwerfen des Filtrats bei 13000 min^{-1} für 1 min.
8. Plazieren der Säule in ein vorher beschriftetes $1,5 \text{ ml}$ Eppendorf-Gefäß und Zugabe von $30 \mu\text{l}$ Puffer EB (bestehend aus 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5). Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur. Herauslösen der DNA aus dem Filter durch erneutes Zentrifugieren bei 13000 min^{-1} für eine min.

Die so gewonnene DNA kann ohne weitere Aufbereitung für die nun folgende PCR zur Vervielfältigung für die nachfolgende Sequenzierung (4facherAnsatz, sonst wie oben) verwandt werden.

Nach erfolgter erfolgreicher PCR (Prüfung durch Agarosegelelektrophorese) müssen die DNA-Proben nun von noch vorhandener genomischer DNA und sonstigen Verunreinigungen mit Hilfe des QIAGEN Purification Kit befreit werden:

1. PCR-Produkt mit $175 \mu\text{l}$ Puffer PB (bestehend aus 3 M Guanidin-Thiocyanat, 10 mM Tris-HCl, 5% Ethanol, pH 6,6) versetzen und auf Reinigungssäule aufbringen. Zentrifugieren bei 13000 min^{-1} für eine min. Verwerfen des Filtrats.
2. Zugabe von $750 \mu\text{l}$ Puffer PE und zweimaliges Zentrifugieren unter zwischenzeitlichem Verwerfen des Filtrats bei 13000 min^{-1} für 1 min.
3. QIAGEN-Säule in vorher beschriftetes Eppendorfgefäß stellen und Zugabe von $30 \mu\text{l}$ Puffer EB. Inkubation bei Raumtemperatur für 3 min. Zentrifugieren bei 13000 min^{-1} für 1 min.

Die so gereinigte DNA kann nun ohne weitere Aufbereitung dem nun folgenden Cycle-Sequencing zugeführt werden.

2.8. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Methode nach Sanger mit farbmarkierten ddNTPs. Die DNA-Polymerase verlängert dabei während des Cycle-Sequencing die Forward- und Reverse-Primer entlang der einzelsträngigen Matrize solange, bis durch den Einbau eines Didesoxynukleotids anstelle eines normalen Nukleotids ein zufälliger Strangabbruch erfolgt. Es entstehen so unterschiedlich lange DNA-Stränge an deren Ende sich jeweils eines der vier unterschiedlich markierten Didesoxynukleotide befindet. Das Prinzip des Cycle-Sequencing ist in Abb. 2.2 verdeutlicht.

Nach erfolgreichem Cycle-Sequencing muss die amplifizierte DNA nochmals gereinigt werden um unerwünschte PCR-Reagentien zu entfernen:

1. Zubereitung einer Sephadex-Lösung mit 55 mg Sephadex und 700 µl Aqua bidest. je Probe. Ansatz bei 4°C für 12 h quellen lassen.
2. Aus obigem Ansatz werden je 700 µl in eine Säule pipettiert und zur Entfernung etwaiger Luftblasen nach Anbringen von Boden und Deckel gevortext.
3. Inkubation bei Raumtemperatur für einige Minuten, bis eine Phasentrennung sichtbar wird.
4. Nach Abnehmen von Boden und Deckel Plazieren der Sephadex-Säule in ein 2 ml Auffanggefäß und Zentrifugation bei 3000 min⁻¹ für 2 min. Verwerfen des Filtrats.
5. Plazieren der Sephadex-Säule in ein vorher beschriftetes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß. Aufbringen der Probe auf den Sephadex-Säule. Zentrifugieren bei 3000 min⁻¹ für 2 min.
6. Inkubation der Probe bei 70 °C in Thermomixer bei geöffnetem Deckel bis die Flüssigkeit verdunstet ist.

Die anschließende Sequenzierung wurde mit dem ABI PRISM™ 377 Trennsystem durchgeführt.

Vorbehandlung der Glasplatten:

1. Reinigung mit Alconox-Detergenz und Spülen mit Aqua bidest.
2. Nachbehandlung mit 10 %igem Isopropanol
3. Nach dem Trocknen Auflegen der Spacer und Zusammensetzen der Glasplatten

Ansetzen des 4.5 %igen Polyacrylamidgels/6M Harnstoff:

1. Mischen der 30 %igen Acrylamidlösung (7,5 ml) mit 10 %igem TBE-Puffer (6 ml) und bidest. Wasser (23 ml).
2. Unter Erwärmen Lösung des Harnstoffs (18 g)
3. Filtrieren und Entgasen durch einen 0,2 µm Filter
4. Überführen der Lösung in ein 150 ml Becherglas
5. Zugabe von 20 µl TEMED und 350 µl APS (10 %ig)
6. Gießen der Lösung zwischen die vorbereiteten Glasplatten und Einsetzen eines Kammes. Anschließend Polymerisation über 1 h.

Nach dem Einsetzen der Glasplatte in den Sequenzierapparat und dem Einbringen des 1 %igen TBE-Laufpuffers in die vorgesehenen Kammern kann mit dem Auftragen der Proben begonnen werden:

1. Lösung der Proben in 2 µl Formamid-EDTA-Lösung (25 mM, pH 8,0)
2. Inkubation bei 90 °C für 2 min in Thermomixer
3. Abkühlen der Proben auf Eis
4. Auftragen von 1 µl pro Probe auf das Gel

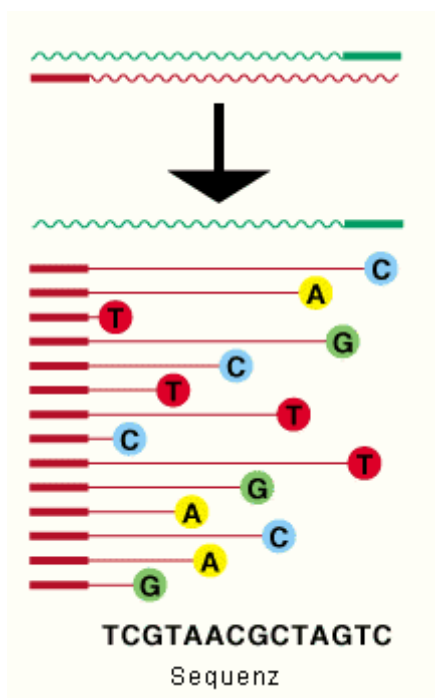


Abb. 2.2: Prinzip des Cycle-Sequencing (schematisch)

2.9. Bezugsquelle der Reagentien

Acrylamidfertiglösung 40%	MERCK
Agarose	SIGMA
Alconox	ALDRICH
Ammoniumacetat	MERCK
Amplitaq	PERKIN ELMER
APS (Ammoniumpersulfat 98%)	SIGMA
Aquamont	BDH
BCIP	BOEHRINGER
BigDye	ABI PRISM
Borsäure pro analysi	MERCK
Bromphenolblau 0,25%	SIGMA
Chloroform	J.T. BAKER
Citronensäure-1-Hydrat	MERCK
CoCl ₂ 25mM	BOEHRINGER
DIG-DNA Labeling Mix	BOEHRINGER
dNTP-Mix 2mM	MBI FERMENTAS
EDTA	SIGMA
Essigsäure pro analysi 100%	MERCK
Ethanol absolut rein 100%	MERCK
Ethidiumbromid	SERVA
FCS	BIOCHROM
Formaldehydlösung 37%	MERCK
Formamid ultra pure grade	AMRESCO
Dextranblau	FLUKA
Glycerin	MERCK
Harnstoff	MERCK
Isopropylalkohol DAC/2-Propanol	CHEMIEVERTRIEB HANNOVER
Kimwipes Lite	KIMBERLEY CLARK
Loading buffer	ABI PRISM
Magnesiumacetat	MERCK
MgCl 25 mM	PERKIN ELMER
MOG-Antikörper	DR. PIDDLSDEN, UNIVERSITÄT CARDIFF

Natriumcarbonat pro analysi	MERCK
NBT	BOEHRINGER
N, N'-Methylenbisacrylamid 2%	MERCK
p53-Antikörper	DAKO
Paraplast	SHERWOOD MEDICAL
PBS (Posphate buffered solution) Dulbeco	BIOCHROM
PCR-Puffer	PERKIN ELMER
Proteinase K	SIGMA
Salpetersäure 65%	MERCK
SDS (Sodiumdodecylsulfate)	SIGMA
Sephadex DNA Grade 6-50 fine	SIGMA
Silan	SIGMA
Silbernitrat reinst	MERCK
Tailingpuffer	BOEHRINGER
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine)	SIGMA
Terminale Transferase	BOEHRINGER
Trizma Base	SIGMA
Xylencyanol 0,25%	SIGMA
Xylol	J.T. BAKER

2.10. Tabellen

Tabelle 2.1: Primersequenzen und Länge der Fragmente

p53 Exon	Sequenz(5' - 3')	Länge
5af	TCAACTCTgTCTCCTTCCTC	155
5ar	CTgTgACTgCTTgTAgATgg	155
5bf	gTgggTTgATTCCACACCCC	162
5br	AACCAgCCCTgTCgTCTCTC	162
6f	gCCTCTgATTCTCACTgAT	166
6r	CAgAgACCCCAgTTgCAAAC	166
7f	gCACTggCCTCATCTTgg	163
7r	TggCAAgtggCTCCTgAC	163
8f	AATgggACAggTAggACCTg	225
8r	ACCgCTTCTTgTCCTgCTTg	225

Tabelle 2.3: SSCP-Bedingungen

p53Exon	Acrylamidkonzentration in %	Leistung in W	Vernetzung	Laufzeit in h	Glycerin in ml
5a	14	6	01:50	15	3
5b	14	6	01:50	15	3
6	14	3	01:50	17	-
7	14	3	01:50	17	-
8a	14	6	01:50	15	3

Tabelle 2.2: Primerannealingtemperaturen

p53 Exon	Temperatur Primerannealing in °C
5a	58
5b	59
6	62
7	57
8	58

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemische Detektion von p53 in MS-Läsionen

Für die vorliegende Studie wurden MS-Fälle mit aktiv-demyelinisierenden Läsionen des Subtyps I und II mit Oligodendrozytenerhalt (sechs Fälle mit 15 Läsionen) und des Subtyps III und IV (16 Fälle mit 33 Läsionen) mit einem Verlust von Oligodendrozyten untersucht. Mittels immunhistochemischer Detektion konnte p53 in MS-Läsionen in Oligodendrozyten nachgewiesen werden. In den Fällen des Subtyps I und II fanden sich nur einige wenige p53-positive Oligodendrozyten. Ungefähr 4% der MOG-positiven Oligodendrozyten exprimierten auch p53. Dagegen fand sich in Fällen mit Oligodendrozytenverlust ein weitaus höherer Anteil p53-positiver Oligodendrozyten, nämlich 41,2% (Tabelle 3.1). Diese p53-positiven Zellen konnten in allen Stadien der Demyelinisierung nachgewiesen werden, mit der größten Anzahl in aktiv demyelinisierenden und remyelinisierenden Läsionen. Da der immunhistochemische Nachweis von p53 bei normalen Konzentrationen in Oligodendrozyten nicht gelingt, kann daraus auf eine vermehrte Expression von p53 in diesen Zellen geschlossen werden. In Muster-III-Läsionen ist die Demyelinisierung mit einem apoptotischen Untergang von Oligodendrozyten assoziiert. Hier fanden sich die p53-positiven Oligodendrozyten im aktiv-demyelinisierenden Bereich der Läsionen, in denen gleichzeitig Oligodendrozyten durch Apoptose zerstört wurden. In Fällen mit primärem Untergang von Oligodendrozyten in der den Plaque umgebenden weißen Substanz (PPWM) (Muster IV) zeigte sich eine DNA-Fragmentierung in Oligodendrozyten in der PPWM zusammen mit einer ausgeprägten Expression von p53 (Abb. 3.1-3.6).

Tabelle 3.1: Anteil der p53-exprimierenden Oligodendrozyten

	Oligodendrozytenerhalt (n=15)	Oligodendrozytenverlust (n=33)
Oligodendrozyten/mm ²	142±52,7	41±22,8
p53-positive Oligodendrozyten	4%	41%

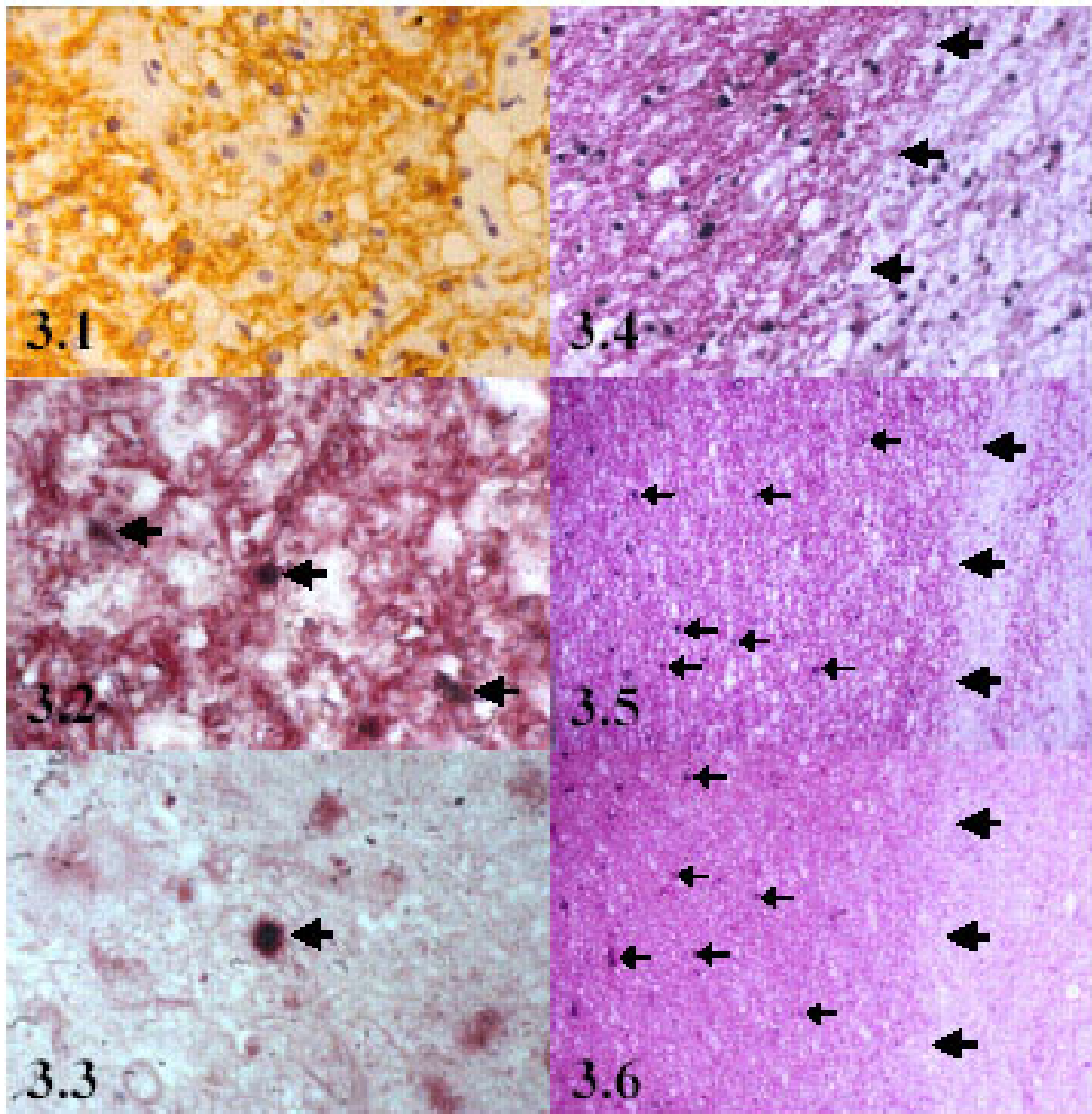


Abb. 3.1-3.3: Entmarkende Läsion vom Muster III.

Abb. 3.1.: In der Immunhistochemie für MOG erkennt man Makrophagen mit MOG-positiven Myelinabbauprodukten sowie MOG-positive apoptotische Oligodendrozyten. **Abb. 3.2,+3.3:** Die Doppelimmunhistochemie für MOG (rot) und p53 (schwarz) zeigt p53-positive Oligodendrozyten.

Abb. 3.4-3.6: Entmarkende Läsion vom Typ IV. Die großen Pfeile markieren die Läsionsgrenze.

Abb. 3.4: Die in situ Hybridisierung für PLP mRNA zeigt einen Verlust von Oligodendrozyten in der Läsion. **Abb. 3.5+3.6:** Der Nachweis der DNA-Fragmentation (schwarz) zeigt MOG-positive zugrundegehende Oligodendrozyten (rot) in der dem Plaque benachbarten weißen Substanz. p53 kolokalisiert mit den zugrundegehenden Oligodendrozyten.

3.2. Ergebnisse des SSCP

Untersucht wurde die DNA von 100 Kontrollen sowie von 107 Patienten mit RR-MS und 49 Patienten mit PP-MS. Dabei beschränkte man sich auf die Exone der DNA-bindenden Region (Exon 5-8). Tabelle 3.2 zeigt die Ergebnisse der SSCP-Analyse der verschiedenen Exone des p53-Proteins. Lediglich in Exon 6 und 7 fanden sich Polymorphismen. Hier zeigte sich in der Häufigkeit des Auftretens kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und RR-MS- bzw. PP-MS-Patienten (Abb. 3.7-3.11).

Tabelle 3.2: Ergebnisse des SSCP

Exon	Polymorphismen	Kontrollen	RR-MS	PP-MS
5a	nein			
5b	nein			
6	ja	5 (5%)	6 (5,6%)	2 (4%)
7	ja	1 (1%)	0	0
8	nein			

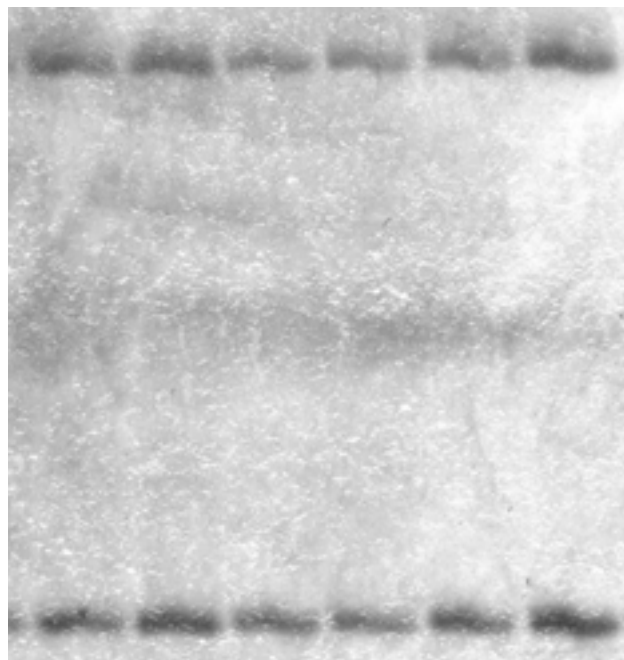


Abb.3.7: SSCP von p53 Exon 5a

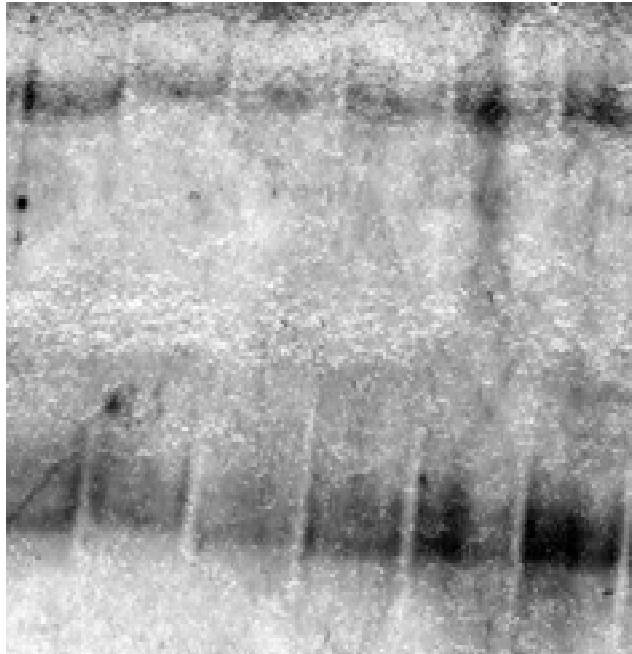


Abb. 3.8: SSCP von p53 Exon 5b: Wildtyp

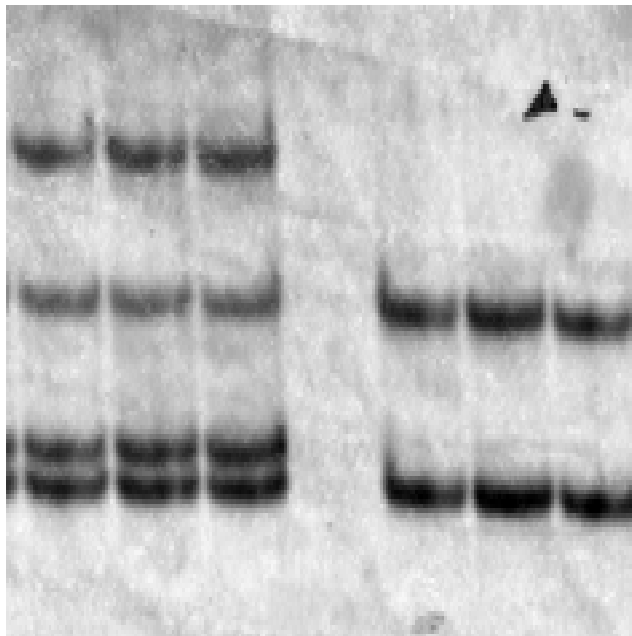


Abb. 3.9: SSCP von p53 Exon 6: Wildtyp und heterozygoter Polymorphismus

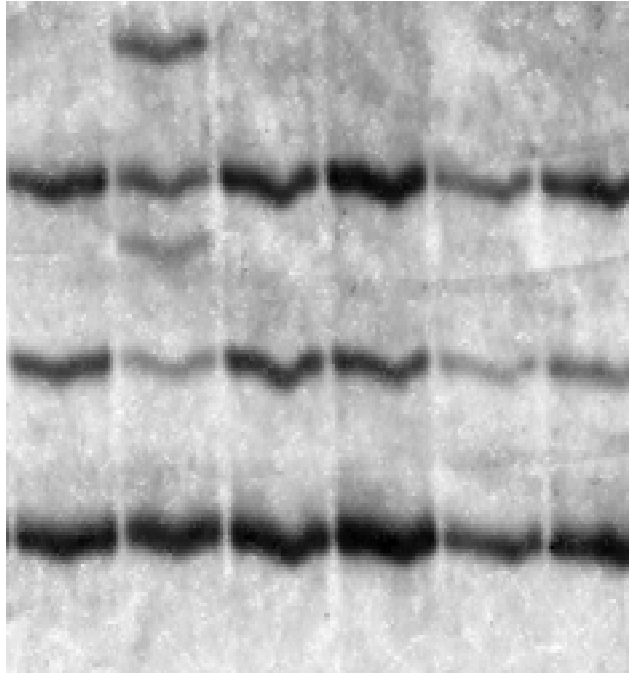


Abb. 3.10: SSCP von p53 Exon 7: Wildtyp und heterozygoter Polymorphismus

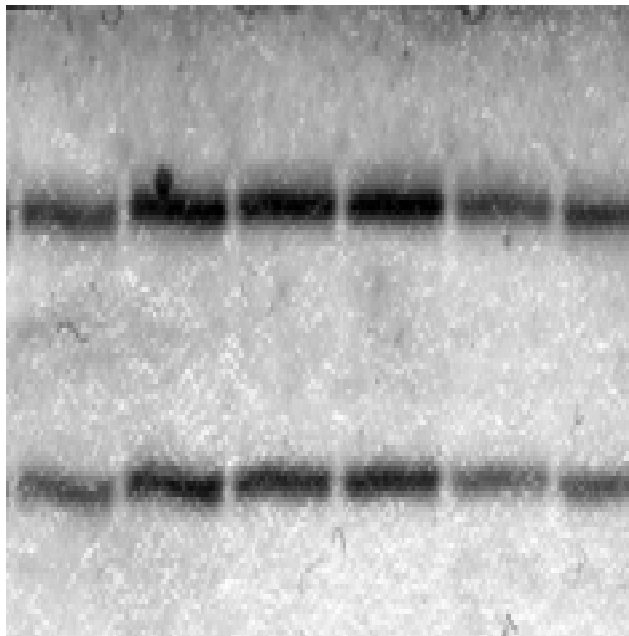


Abb. 3.11: SSCP von p53 Exon 8: Wildtyp

3.3. Ergebnisse der Sequenzierung

Die Sequenzierung des Polymorphismus in Exon 6 zeigte, dass es sich um den bereits bekannten Polymorphismus in Codon 213 handelte, der mit einer Prävalenz von bis zu 11% in der Bevölkerung auftritt (Carbone et al. 1991) und in der vorliegenden Untersuchung stets in heterozygoter Form auftrat (Abb. 3.12). Die Base Adenin im Wildtyp ist durch die Base Guanin im Polymorphismus ersetzt. Aus dem Codon CGA wird so das Codon CGG. Da beide für die Aminosäure Arginin codieren, entsteht durch diese Veränderung kein Shift auf Ebene der Aminosäuresequenz. Das p53-Protein wird demzufolge durch diese Veränderung auf Ebene der DNA-Sequenz auch nicht in seiner Sequenz/Primärstruktur verändert. In Exon 7 war in einem Kontrollfall in Codon 237 die Base Adenin im Wildtyp durch die Base Guanin im Polymorphismus ausgetauscht (Abb. 3.13). Dieser Polymorphismus lag ebenfalls in heterozygoter Form vor. Aus dem Codon AAC wird so das Codon AGC. Auf Ebene der Aminosäuresequenz wird die Aminosäure Asparagin durch die Aminosäure Serin ersetzt (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Sequenzierung

Kontrollen					
	Polymorphismen	Sequenzveränderung	Aminosäureshift	Codon	Prävalenz
Exon					
5a	nein				
5b	nein				
6	ja, (n=5)	CGA -CGG	nein	213	bis 11%
7	ja, (n=1)	AAC -AGC	Asn ▶ Ser	237	?
8	nein				
Patienten					
RR-MS					
Exon					
5a	nein				
5b	nein				
6	ja, (n=6)	CGA -CGG	nein	213	bis 11%
7	nein				
8	nein				
PP-MS					
Exon					
5a	nein				
5b	nein				
6	ja, (n=2)	CGA -CGG	nein	213	bis 11%
7	nein				
8	nein				

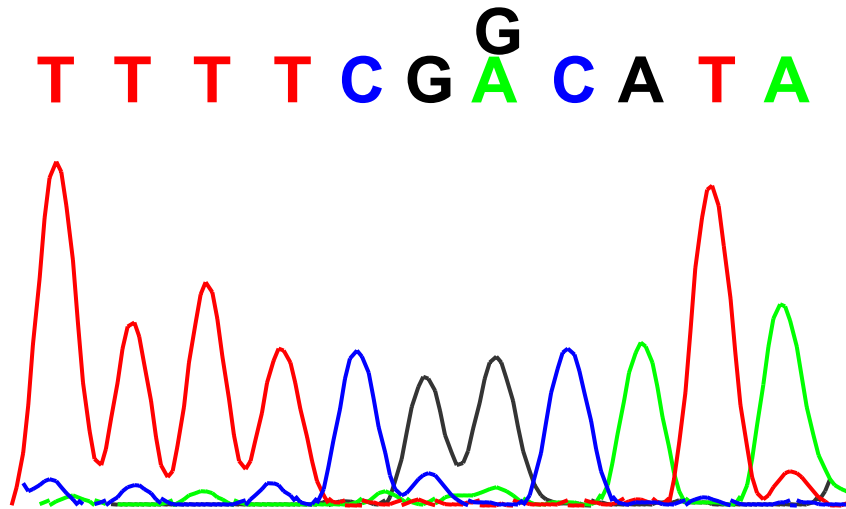


Abb. 3.12: Sequenzveränderung des Polymorphismus in Exon6 (Codon 213)

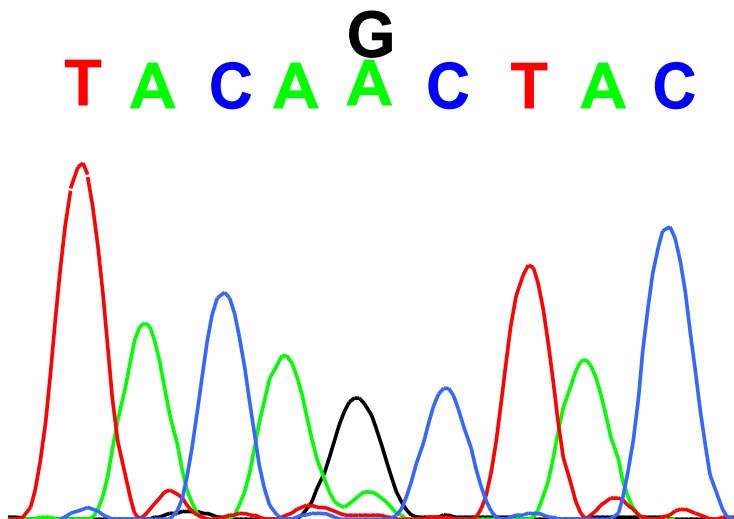


Abb. 3.13: Sequenzveränderung des Polymorphismus in Exon 6 (Codon 213)

3.4. Korrelation von Verlaufsformen der MS und p53-Polymorphismen

Vergleicht man die relative Häufigkeit des Auftretens von Sequenzveränderungen in Kontrollen und MS-Patienten sowie in den verschiedenen Verlaufsformen (RR- bzw. PP-MS), so ergibt sich kein Unterschied. Die gefundenen Polymorphismen scheinen dementsprechend also keinen Einfluss auf die Verlaufsform der MS zu besitzen.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen Oligodendrozytendestruktion und Expression von p53 in Oligodendrozyten in MS-Läsionen ($p < 0,0001$; Fisher's exact Test). Eine mögliche Ursache für das vermehrte Vorkommen von p53 in Oligodendrozyten in bestimmten MS-Läsionen könnten Mutationen im p53-Gen sein. Da diese Feststellung alleine keine Aussage über einen kausalen Zusammenhang zwischen Oligodendrozytenverlust und p53-Expression zulässt, wurden Blutproben von MS-Patienten und Kontrollen auf das Auftreten von p53-Polymorphismen hin untersucht. Zumindest in der Region für der für die Funktion des Proteins wichtigsten Abschnitte (Exon 5 – Exon 8) fanden sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Populationen.

4. Diskussion

4.1. Die Expression von p53 in Oligodendrozyten bei Multipler Sklerose

Erkenntnisse hinsichtlich der Rolle von p53 für die Oligodendrozytenpathologie der MS liegen bislang nur in Form weniger Daten vor. Man weiss, dass in vitro durch Apoptoseinduktion mittels TNF- α p53 induziert wird. Die Überexpression von p53 in Oligodendrozyten von Mäusen führt zu Apoptose (Ladiwala et al. 1999). In den Subtypen III und IV nach Lucchinetti et al. 2000b lässt sich eine erhöhte Expression von p53 immunhistochemisch nachweisen. Daher liegt es nahe zu vermuten, dass eine solche Überexpression auf irgendeine Weise am apoptotischen Untergang von Oligodendrozyten beteiligt sein könnte. In vitro konnten Wosik et al. 2001 bereits zeigen, dass eine hohe Expression von p53 Apoptose induziert, eine niedrigere (sub-letale) Expression dagegen nicht zum Zelltod führt, aber die Zellen empfänglicher für Ligand-Rezeptor vermittelte Apoptose werden lassen. Ob die Überexpression von p53 in Oligodendrozyten in MS-Läsionen auf ein funktionell defektes Protein oder auf eine vermehrte Transkription zurückzuführen ist, muss in weiteren Studien geklärt werden. Die Beobachtung eines selektiven Anstiegs von p53 in Oligodendrozyten, die in eine Immunreaktion verwickelt waren, liefert Hinweise um zukünftig Läsionen mit einer Störung des Oligodendrozytenmetabolismus (Muster III und IV) von solchen mit einer typisch autoimmunen Pathogenese (Muster I und II) unterscheiden zu können.

4.2. p53-induzierter Zelltod in Tumor- und Autoimmunerkrankungen

Mutationen im p53 Gen sind eine ebenso bekannte wie häufige Ursache für die Entstehung von verschiedensten Tumoren. Veränderungen in der Proteinstruktur können zur Entstehung eines funktionsuntüchtigen Protein führen und nachfolgend zu einer Störung des Apoptosevorgangs in Zellen mit DNA-Schäden und damit letztlich zu einer unkontrollierten Proliferation von Tumorzellen mit all ihren bekannten Folgen. In Tumoren betreffen verschiedene Mutationen in Form der sogenannten „hot spots“ bevorzugt bestimmte Codons der DNA-bindenden Region des p53-Proteins und führen so zu einer wesentlichen Beeinträchtigung seiner Funktion.

Auch für die rheumatoide Arthritis spielt eine Störung des Apoptosemechanismus in Form einer Störung des p53-induzierten programmierten Zelltodes möglicherweise eine Rolle. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in Fibroblasten eine Reihe verschiedener Mutationen im p53-Gen nachweisen, allerdings weniger häufig als in Tumoren. Die Häufigkeit der Mutationen variierte allerdings in verschiedenen Studien beträchtlich, in einigen Fällen konnten gar keine Mutationen nachgewiesen werden (Müller-Ladner und Nishioka 2000).

4.3. Mögliche Bedeutung der veränderten Expression von p53 in der MS

Der mit einer veränderten Expression von p53 möglicherweise in Zusammenhang stehende vermehrte Untergang von Oligodendrozyten könnte die Ursache für chronische Verlaufsformen der MS sein. Der Verlust von Oligodendrozyten könnte eine Erklärung für die fehlende Remyelinisierung in einigen Läsionen sein. Eine p53-vermittelte Apoptose als Reaktion auf die bekannten auslösenden Stimuli wie Entzündung, Ischämie, Hypoxie, Trauma, verschiedene Zytokine oder Virusinfekt kommt möglicherweise als Ursache hierfür in Frage, da einige dieser Mechanismen auch in der Ätiopathogenese der MS beteiligt zu sein scheinen.

4.4. Bedeutung von Polymorphismen im p53 Gen für die MS

Da mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises nicht zwischen Wild-Typ-p53 und einem strukturell veränderten Protein unterschieden werden kann, sollte mit Hilfe der Sequenzierung geklärt werden, ob es auf Ebene der DNA Veränderungen in der codierenden Region des p53-Gens gibt. Der Fokus der Untersuchung lag dabei auf der DNA-bindenden Region. Da sich keine Unterschiede zwischen Kontrollen und RR- bzw. PP-MS Patienten fanden, scheint eine auf die Proteinstruktur zurückgehende Anomalie des p53-Gens, wie sie in Tumoren und manchen Autoimmunerkrankungen auftritt, eher unwahrscheinlich. Was letztlich zu einer Überexpression von p53 in Oligodendrozyten mit nachfolgender Apoptose führt, konnte bislang nicht geklärt werden.

4.5. Korrelation der histopathologischen Subtypen mit p53-Expression

Die unterschiedlichen histopathologischen Muster belegen, dass möglicherweise verschiedene pathogenetisch relevante Schädigungswege an der Entstehung einer Multiplen Sklerose beteiligt sind. Die Frage, ob die Zerstörung von Myelin oder der Untergang von Oligodendrozyten das auslösende Moment für die Entstehung einer Multiplen Sklerose ist, wird seit langem kontrovers diskutiert. Studien, die aktiv demyelinisierende Läsionen untersuchten, legen nahe, dass es mehrere völlig verschiedene Muster der Myelinschädigung und der Oligodendrozytenpathologie gibt (Lucchinetti et al. 1999, Lucchinetti et al. 1996, Brück et al. 1994, Ozawa et al. 1994). Anhand dieser Unterschiede schlugen Lucchinetti et al. 2000b ein Klassifikationssystem mit vier verschiedenen histopathologischen Mustern vor. Muster I und II zeigen große Ähnlichkeit mit einer T-Zell- oder T-Zell- und antikörpervermittelten Autoimmunenzephalomyelitis, während Muster III und IV eher Zeichen eines primären Oligodendrozytenschadens aufweisen, die eher an eine virus- oder toxininduzierte Dystrophie als an eine Autoimmunerkrankung erinnern. In Muster I und II findet sich eine primäre Zerstörung von perivenösem Myelin durch T-Zellen/Makrophagen oder Antikörper/Komplement-Komplexe mit einem geringen Verlust von Oligodendrozyten oder deren Vorläuferzellen. Nachfolgend kommt es hier zu einer ausgeprägten Remyelinisierung innerhalb des inaktiven Zentrums der Läsion. Dagegen finden sich in Muster III eine nicht-perivenöse Demyelinisierung, eine verminderte MAG-Expression und Zeichen eines apoptotischen Oligodendrozytenuntergangs. Diese Art von Läsionen tritt zumeist in Fällen mit einem erst kurzen Krankheitsverlauf auf und wird selten in Patienten mit chronischen Krankheitsverläufen beobachtet. Es könnte sich daher also um eine „Starter-Läsion“ handeln. Im vierten Muster kommt es zu einem frühen Untergang von Oligodendrozyten in der normal erscheinenden weißen Substanz. Aufgrund der fundamental unterschiedlichen Mechanismen und Angriffspunkte der letztlich in allen Mustern resultierenden Demyelinisierung liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den verschiedenen Subtypen um eigenständige Krankheitsentitäten handeln könnte, wenngleich weder Ursache noch Abfolge der einzelnen pathogenetischen Mechanismen geklärt sind. Muster IV findet sich ausschließlich in Autopsien/Biopsien von Patienten mit PP-MS. Auch Übergänge von einem in ein anderes Muster erscheinen denkbar. Die Tatsache, dass sich eine vermehrte Expression von p53 mit nachfolgender Apoptose von Oligodendrozyten nur in Muster III und IV findet (Wosik

et al. 2001), suggeriert in diesem Zusammenhang, dass ein Defekt der Funktion, der Transkription oder der induzierenden und regulierenden Mechanismen vorliegen könnte.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Suche nach Polymorphismen innerhalb der codierenden Region als mögliche Ursache für eine vermehrte Expression des p53-Proteins in Oligodendrozyten in MS-Läsionen. Es fanden sich jedoch weder Unterschiede zwischen Kontrollen und MS-Patienten, noch zwischen RR- und PP-MS-Patienten. Daher scheinen Sequenzveränderungen innerhalb der DNA-bindenden Region keine Rolle für bei der vorher gefundenen vermehrten Expression zu spielen. Weitere mögliche Ursachen für eine erhöhte p53-Expression könnten Anomalien im Bereich der Promotor- und Enhancerregion des p53-Gens, auf Ebene der Transkriptionsfaktoren oder Antagonisten sein. Es bleibt daher abzuwarten inwiefern weitere in vivo- und in vitro-Studien in diesem Zusammenhang neue Erkenntnisse zeitigen werden und damit Hinweise auf die immer noch unklare Pathogenese der MS liefern können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von MS-Patienten und Gesunden auf das Vorkommen von DNA-Polymorphismen hin untersucht, um so eine mögliche Erklärung für die vorher gefundene erhöhte Expression von p53 in Oligodendrozyten in MS-Läsionen zu liefern. Dabei fand sich mit Hilfe der angewendeten Methoden kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben nichtsdestotrotz Anlass zu vermuten, dass p53 in einigen histologischen Subtypen der MS – in welcher Form auch immer – an der Pathogenese oder dem Untergang von Oligodendrozyten in MS-Läsionen beteiligt zu sein scheint. Die gefundene erhöhte Expression ist in ihrer Ätiologie bislang noch nicht geklärt. Dennoch könnten weitere Untersuchungen p53-abhängiger Mechanismen, die zu einer Zerstörung von Myelin/Oligodendrozyten führen, einen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapiestrategien leisten. Sowohl neue immunmodulatorische als auch neuroprotektive Therapien erscheinen in diesem Zusammenhang denkbar.

Literatur

Akassoglou, K., Bauer, J., Kassiotis, G., Pasparakis, M., Lassmann, H., Kollias, G., Probert, L. 1998: Oligodendrocyte Apoptosis and Primary Demyelination Induced by Local TNF/p55TNF Receptor Signaling in the Central Nervous System of Transgenic Mice. *American Journal of Pathology*, **153**; 801-813.

Andersson, M., Alvarez-Cermeno, J., Bernardi, G., Cogato, I., Fredman, P., Frederiksen, J., Fredrikson, S., Gallo, P., Grimaldi, L.M., Gronning, M. et al. 1994: Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **57**; 897-902.

Bates, S., Vousden, K.H. 1999: Mechanisms of p53 mediated apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**; 28-37.

Bauer, J., Stadelmann, C., Bancher, C., Jellinger, K., Lassmann, H. 1999: Apoptosis of T Lymphocytes in acute disseminated encephalomyelitis. *Acta Neuropathologica*, **97**; 543-546.

Berger, T., Weerth, S., Kojima, K., Linington, C., Wekerle, H., Lassmann, H. 1997: Experimental autoimmune encephalomyelitis: The antigen specificity of T-Lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Laboratory Investigations*, **76**; 355-364.

Bonetti, B., Raine, C.S. 1994: Multiple Sclerosis: oligodendrocytes display cell death-related molecules but do not undergo apoptosis. *Annals of Neurology*, **42**; 74-84.

Bronnum-Hansen, H., Koch-Henriksen, N., Hyllested, K. 1994: Survival of Patients with multiple sclerosis in Denmark: A nationwide, long term epidemiologic survey. *Neurology*, **44**; 1901-1907.

Brück, W., Porada, P., Poser, S., Rieckmann, P., Hanefeld, F., Kretzschmar, H.A., Lassmann, H. 1995: Monocyte/Macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, **38**; 554-566.

Brück, W., Schmied, M., Suchanek, G., Brück, Y, Breitschopf, H., Poser, S., Piddlesden, S., Lassmann, H. 1994: Oligodendrocytes in the Early Course of Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, **35**; 65-73.

Burgmaier, G., Schönrock, M.L., Kuhlmann, T., Richter-Landsberg, C., Brück, W. 2000: Association of increased bcl-2 expression with rescue from TNF- α induced cell death in the oligodendrocyte cell line OLN-93. *Journal of Neurochemistry*, **75**; 2270-2276.

Cammer, W. 2000: Effects of TNF- α on immature and mature oligodendrocytes and their progenitors in vitro. *Brain research*, **864**; 213-219.

Carbone, D., Chiba, I., Mitsudomi, T. 1991: Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene*, **6**;1691-1692.

Casaccia-Bonofil, P. 2000: Cell Death in the Oligodendrocyte Lineage: A molecular Perspective of Life/Death Decisions in Development and Disease. *Glia*, **29**; 124-135.

Caulin, C., Salvesen, G.S., Oshima, R.G. 1997: Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *Journal of Cell Biology*, **138**; 1379-1394.

Celius, E.G., Harbo, H.F., Egeland, T., Vartdal, F., Vandvik, B., Spurkiand, A. 2000: Sex and age at diagnosis are correlated with the HLA-DR2, DQ6 haplotype in multiple sclerosis. *Journal of Neurological Sciences*, **178**; 132-135.

Charcot, J.M. 1868: Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hôp*, **41**; 554-555, 557-558, 566.

Chataway, J., Feakes, R., Coraddu, F., Gray, J., Deans, J., Fraser, M., Robertson, N., Broadley, S., Jones, H., Clayton, D., Goodfellow, P., Sawcer, S. Compston, A. 1998: The genetics of multiple sclerosis: principles, background and updated results of The United Kingdom systematic genome screen. *Brain*, **121**; 1869-1887.

Chehab, N.H., Malikazay, A., Appel, M., Halazonetis, T.D. 2000: Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes & Development*, **14**; 278-288.

Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, J.D., Pavletich, N.P. 1994: Crystal structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations. *Science*, **265**; 346-355.

Chung, H.T., Pae, H.O., Choi, B.M., Billiar, T.R., Kim, Y.M. 2001: Nitric Oxide as a Bioregulator of Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **282**; 1075-1079.

Comi, G., Fillipi, M., Wolinsky, J.S. 2001: European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebocontrolled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Annals of Neurology*, **49**; 290-297.

Compston, D.A.S. 1990: The Dissemination of multiple sclerosis. The Langdon-Brown lecture 1989. *Journal of the Royal College of Physicians London*, **24**; 207-218.

Compston, A. 1998: Genetic susceptibility to multiple sclerosis. In Mc Alpine's *Multiple Sclerosis* 3rd edition pp. 101-142 (ed. A.Compston) Churchill Livingstone, London.

Coraddu, F., Sawcer, S., Feakes, R., Chataway, J., Broadley, S., Jones, H.B., Clayton, D., Gray, J., Smith, S. Taylor, C., Goodfellow, P.N., Compston, A. 1998: HLA typing in the multiple sclerosis genome screen. *Neurogenetics*, **2**; 24-33.

Correale, M.D., Gilmore, W., Li, S., Walsh, J., Bassani, M.M., Lund, B., Arias, M., Weiner, L.P. 2000: Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in PLP peptide-specific T cell clones from patients with chronic MS. *Journal of Neuroimmunology*, **109**; 197-210.

Cowan, J.M.A., Dick, J.P.R., Day, B.L., Rothwell, J.C., Thompson, P.D., Marsden, C.D. 1984: Abnormalities in central motor pathway conduction in multiple sclerosis. *Lancet*, **2**; 304-307.

Dean, G. 1967: Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *British Medical Journal*, **2**; 724-730.

Detels, R., Visscher, B.R., Malmgren, R.M., Coulson, A.H., Lucia, M.V., Dudley, J.P. 1977: Evidence for lower susceptibility to multiple sclerosis in Japanese-Americans. *American Journal of Epidemiology*, **105**; 303-310.

Dowling, P., Ming, X., Raval, S, Husar, W., Cassacia-Bonnefil, P. Chao, M. Cook, S., Blumberg, B. 1999: Upregulated p75^{NTR} neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology*, **53**; 1615-1616.

D'Souza, S.D., Bonetti, B., Balasingam, V., Cashman, N.R., Barker, P.A., Troutt, A.B., Raine, C.S., Antel, J.P. 1996: Multiple Sclerosis: Fas Signaling in Oligodendrocyte Cell Death. *Journal of Experimental Medicine*, **184**; 2361-2370.

D'Souza, S.d., Alinauskas, K.A., Antel, J.P. 1996: Ciliary Neurotrophic Factor Selectively Protects Human Oligodendrocytes From Tumor Necrosis Factor-Mediated Injury. *Journal of Neuroscience Research*, **43**; 289-298.

Ebers G.C., Sadovnick A.D. 1994: Association studies in multiple sclerosis. *Journal of Neuroepidemiology*, **53**; 117-122.

Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V. Schwartz, M. 1996: p53 plays a Regulatory Role in Differentiation and Apoptosis of Central Nervous System-Associated Cells. *Molecular and Cellular Biology*, **16**; 5178-5185.

Fesus, L. 1993: Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Letters*, **328**;1-5.

Fraser, A., Evan, G. 1996: A License to kill. *Cell*, **85**; 781-784.

Garell, P.C., Menezes, A.H., Baumbach, G., Moore, S.A., Nelson, G., Mathews, A.K. 1998: Presentation, Management and follow-up of Schilder's disease. *Pediatric Neurosurgery*, **29**; 86-91.

Gold, R., Hartung, H-P, Lassmann, H. 1997: T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. *Trends in Neurosciences*, **20**; 399-404.

Gostissa, M., Henstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M., Del Sal, G. 1999: Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO Journal*, **18**; 6462-6471.

Greidinger, E.L., Miller, D.K., Yamin, T.T., Casciola-Rosen, L., Rosen, A. 1996: Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Letters*, **390**; 299-303.

Griot, C., Vandeveld, M., Richard, A., Peterhans, E., Stocker, R. 1990: Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by reactive oxygen species. *Free Radical Results Communications*, **11**; 181-193.

Gu, W., Roeder, R.G. 1997: Activation of p53 sequence specific DNA binding by acetylation of the C-terminal domain. *Cell*, **90**; 595-606.

Halliday, A.M., McDonald, W.I., Mushin, J. 1972: Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet*, **6**; 982-985.

He, Y., Grossmann, R.I., Udupa, J.K., Fulton, J., Constantinescu, C.S., Gonzales-Scrano, F., Babb, J.S., Mannon, L.J., Kolson, D.L., Cohen, J.A. 2000: Glatiramer acetate (Copaxone) treatment in relapsing-remitting MS. Quantitative MR assessment. *Neurology*, **54**; 813-817.

He B., Xu C., Yang B., Landtblom, A.M., Fredrikson, S., Hillert, J. 1998a: Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, **86**; 13-19.

He, B., Yang, B., Lundahl, J., Fredrikson, S., Hillert, J. 1998b: The myelin basic protein gene in multiple sclerosis: identification of discrete alleles of a 1.3 kb tetranucleotide repeat sequence. *Acta Neurologica Scandinavica*, **97**; 46-51.

Hernan, M.A., Zhang, S.M., Lipworth, L., Olek, M.J., Ascherio, A. 2001: Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology*, **12**; 301-306.

Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J. 1990: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, **348**; 334-336.

Hogancamp, W.E., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G. 1997: The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clinic Proceedings*, **72**; 871-878.

Hohlfeld, R. 1999: Therapeutic strategies in multiple sclerosis. I. Immunotherapy. *Philosophical Transactions of the royal society: Biological Sciences*, **1390**; 1697-1710.

Hou J.B., Zhang Z.X. 1992: Prevalence of multiple sclerosis: a door-to-door survey in Lan Cang La Hu Zu Autonomous County, Yunnan Province of China. *Neuroepidemiology*, **11**; 52.

Huppertz, B., Frank, H.G., Kaufmann, P. 1999: The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualisation. *Anatomy and Embryology*, **200**; 1-18.

Juurlink, B. H. J., Thorburne, S.K., Hertz, L 1998: Peroxide-Scavenging Deficit Underlies Oligodendrocyte Susceptibility to Oxidative Stress. *Glia*, **22**; 371-378.

Karaarslan, E., Altintas, A., Senol, U., Yeni, N., Dincer, A., Bayindir, C., Karaagac, N., Siva, A. 2001: Balo's Concentric Sclerosis: Clinical and Radiologic Features of Five Cases. *American Journal of Neuroradiology*, **22**; 1362-1367.

Kassiotis, G., Bauer, J., Akassoglou, K., Lassmann, H., Kollias, G., Probert, L. 1999: A tumor necrosis factor-induced model of human primary demyelinating diseases develops in immunodeficient mice. *European Journal of Immunology*, **29**; 912-917.

Kerr, J.F., Gobe, G.C., Winterford, C.M., Harmon, B.V. 1995: Anatomical methods in cell death. *Methods in Cell Biology*, **46**; 1-27.

Kira, J., Kanai, T., Nishimura, Y., Yamasaki, K., Matsushita, S., Kawano, Y., Hasuo, K., Tobimatsu, S., Kobayashi, T. 1996: Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Annals of Neurology*, **40**; 569-574.

Kuhlmann, T., Lucchinetti, C., Zettl, U.K., Bitsch, A., Lassmann, H., Brück, W. 1999: Bcl-2-Expressing Oligodendrocytes in Multiple Sclerosis Lesions. *Glia*, **28**; 24-39.

Kuroiwa, Y., Igata, A., Itahara, K., Koshijima, S., Tsubaki, T. 1975: Nationwide survey of multiple sclerosis in Japan. Clinical analysis of 1084 cases. *Neurology*, **25**; 845-851.

Kurtzke, J.F. 1995: MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurologica Scandinavica*, Suppl. 1995; **161**; 23-33.

Ladiwala, U., Li, H., Antel, J.P., Nalbantoglu, J. 1999: p53 Induction by Tumor Necrosis Factor- α and Involvement of p53 in Cell Death of Human Oligodendrocytes. *Journal of Neurochemistry*, **73**; 605-611.

Lassmann, H. 1998: Pathology of multiple sclerosis. In McAlpine's multiple sclerosis, 3rd edn (ed. A. Compston), pp. 323-358. London: Churchill Livingstone.

Lassmann, H. 1983: The Pathology of Inflammatory Demyelinating Lesions. In Comparative Neuropathology of Chronic Experimental Allergic Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis, pp. 9-95.. Berlin Heidelberg: Springer.

Lin, Y., Ma, W., Benchimol, S. 2000: Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nature Genetics*, **26**; 124-127

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. 1997: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, **89**; 175-184.

Lublin, F.D., Reingold, S.C. 1996: Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology*, **46**; 907-911.

Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H. 2000: Heterogeneity of multiple sclerosis: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, **47**; 707-717.

Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H. 1999: A quantitative analysis of Oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Brain*, **122**; 2279-2295.

Lucchinetti, C.F., Brück, W., Rodriguez, M., Lassmann, H. 1998: Multiple Sclerosis: Lessons from Neuropathology. *Seminars in Neurology*, **18**; 337-350.

Lucchinetti, C.F., Brück, W., Rodriguez, M., Lassmann, H. 1996: Distinct Patterns of Multiple Sclerosis Pathology Indicates Heterogeneity on Pathogenesis. *Brain Pathology*, **6**; 259-274.

Luomala, M., Elovaara, I., Ukkonen, M., Koivula, T., Lehtimäki, T. 2001: The combination of HLA-DR1 and HLA-DR53 protects against MS. *Neurology*, **56**; 383-385.

Marrosu, M.G., Murru, M.R., Costa, G., Cucca, F., Sotgiu, S., Rosati, G., Muntoni, F. 1997: Multiple Sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and –DR4 alleles. *American Journal of Human Genetics*, **61**; 454-457.

Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., Green, D.R. 1995: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine*, **182**; 1545-1556.

Mason, J.L., Jones, J.J., Taniike, M., Morell, P., Suzuki, K., Matsushima, G.K. 2000: Mature Oligodendrocyte Apoptosis precedes IGF-1 Production and Oligodendrocyte Progenitor Accumulation and Differentiation During Demyelination/Remyelination. *Journal of Neuroscience Research*, **61**; 251-262.

Masterman, T., Ligers, A., Olsson, T., Andersson, M., Olerup, O., Hillert, J. 2000: HLA-DR15 Is Associated with Lower Age at Onset in Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, **48**; 211-219.

McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S., Evan, G.I. 1997: Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *Journal of Cell Biology*; **136**; 215-227.

McDonald, W.I., Ron, M.A. 1999: Multiple sclerosis: the disease and its manifestations. *Philosophical Transactions of the royal society: Biological Sciences*, **1390**; 1615-1622.

McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., (and 13 others) 2001: Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, **50**; 121-127.

McDonnell, G.V., Mawhinney, H., Graham, C.A., Hawkins, S.A., Middleton, D. 1999: A study of the HLA-DR region and clinical subgroups of multiple sclerosis and its influence on prognosis. *Journal of Neurological Sciences*, **165**; 77-83.

Mews, I., Bergmann, M., Bunkowsky, S., Gullotta, F., Brück, W. ,1998:
Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions.
Multiple Sclerosis, **4**; 55-62.

Mignotte, B., Vayssiere, J.L. 1998: Mitochondria and apoptosis. European Journal of Biochemistry, **252**; 1-15.

Müller-Ladner, U., Nishioka, K. 2000: p53 in rheumatoid arthritis: friend or foe?
Arthritis Research, **2**;175-178.

Multiple Sklerose-Therapie-Konsensus-Gruppe (MSTKG) 1999:
Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose. Nervenarzt, **70**; 371-386.

Multiple Sklerose-Therapie-Konsensus-Gruppe (MSTKG) 2001:
Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose. 1. Ergänzung:
Dezember 2000. Nervenarzt, **72**; 150-157.

Myashita, T., Reed, J.C. 1995: Tumor supressor p53 is a direct transcriptional activator of the bax gene. Cell, **80**; 293-299.

Mycko, M.P., Kwinowski, M., Tronczynska, E., Szymanska, B., Selmaj, K.W. 1998:
Multiple Sclerosis: the increased frequency of the ICAM-1 exon 6 gene point mutation genetic type K469. Annals of Neurology, **44**; 539-542.

Nakajima, T., Morita, K., Ohi, N., Arai, T., Nozaki, N., Kikuchi, A., Osaka, F., Yamao, F., Oda, K. 1996: Degradation of topoisomerase II alpha during adenovirus E1A-induced apoptosis is mediated by the activation of the ubiquitin proteolysis system. Journal of Biological Chemistry, **271**; 24842-24849.

Nakano, K. K., Vousden, K.H. 2001: PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Molecular Cell, **7**; 683-694.

Noseworthy, J.H., O'Brien, P.C., Weinshenker, B.G., Weis, J.A., Petterson, T.M., Erickson, B.J., Windebank, A.J., Whisnant, J.P., Stolp-Smith, K.A., Harper Jr., C.M., Low, P.A., Romme, L.J., Johnson, M., An, K.N., Rodriguez, M 2000a: IV immunoglobulin does not reverse established weakness in MS. A double blind, placebo-controlled trial. *Neurology*, **55**; 1135-1143.

Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez M., Weinshenker, B.G. 2000b: Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, **343**; 938-52.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokini, T., Taniguchi, T., Tanaka, N. 2000a: Noxa, a BH-3 only member of the Bcl-2 family and a candidate mediator of the p53-induced apoptosis. *Science*, **288**; 1053-1058.

Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., Taya, Y 2000b: p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, **102**; 849-862.

Oger, J., Lai, H. 1994: Demyelination and ethnicity: experience at the University of British Columbia Multiple Sclerosis Clinic with special reference to HTLV-I-associated myelopathy in British Columbian natives. *Annals of Neurology*, **36**; Suppl. S22-24.

Oksenberg, J.R., Baranzini, S.E., Barcellos, L.F., Hauser, S.L. 2001: Multiple Sclerosis: Genomic rewards. *Journal of Neuroimmunology*, **113**; 171-184.

Olerup, O., Hillert, J. 1991: HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens*, **38**; 1-15.

Olerup, O., Hillert, J., Fredrikson, S., Olsson, T., Kam-Hansen, S., Moller, E., Carlsson, B., Wallin, J. 1989: Primarily chronic progressive and relapsing/remitting multiple sclerosis: two immunogenetically distinct disease entities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**; 7113-7117.

Ormerod, I.E., Miller, D.H., McDonald, W.I., du Boulay, E.P., Rudge, P., Kendall, B.E., Moseley, I.F. et al. 1987: The role of NMR imaging in the assessment of multiple sclerosis and isolated neurological lesions: a quantitative study. *Brain*, **110**; 1579-1616.

Ozawa, K., Suchanek, G., Breitschopf, H., Brück, W., Budka, H., Jellinger, K., Lassmann, H. 1994: Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain*, **117**; 1311-1322.

Page, W.F., Mack, T.M., Kurtzke, J.F., Murphy, F.M., Norman, J.E. Jr. 1995: Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans. 6. Population ancestry and surname ethnicity as risk factors for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*, **14**; 286-296.

Pavelko, K.D., Drescher, K.M., McGavern, D.B., David, S.C., Rodriguez, M. 2000: HLA-DQ Polymorphism Influences Progression of Demyelination and Neurologic Deficits in a Viral Model of Multiple Sclerosis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **15**; 495-509.

Pender, M. P. 1998: Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis. *Lancet*, **351**; 978-981.

Pette, M., Fujita, K., Kitze, B., Whitaker, J.N., Albert, E., Kappos, L., Wekerle, H. 1990: Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology*, **40**; 1770-1776.

Poser, C.M., Paty, P.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Sibley, W., Silberberg, D.H., Tourtellotte, W.W. 1983: New Diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of Neurology*, **13**; 227-231.

Poser, C.M. 1994: The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Annals of Neurology*, **36**; Suppl. 2:S 180-193.

Poser, C.M. 1995: Notes on the epidemiology of multiple sclerosis. *Journal of the Formos Medical Association*, **94**; 300-308.

Poser, C.M. Brinar, V.V., 2001: Diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **103**; 1-11.

Prineas, J. W.: The Neuropathology of Multiple Sclerosis. In: J.C. Koetsier (Hrsg): *Demyelinating Diseases*. S. 213-257. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1985.

Prineas, J.W., Barnard, R.O., Kwon, E.E., Sharer, L.R., Cho, E.S. 1993: Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Annals of Neurology*, **33**; 137-151.

Raine, C.S., Bonetti, B. Cannella, B. 1998: Multiple sclerosis: expression of molecules of the tumor necrosis factor ligand and receptor families in relationship to the demyelinated Plaque. *Revue Neurologique*, **154**; 577-585.

Renvoize, C., Roger, R., Mouliau, N., Bertoglio, J., Breard, J. 1997: Bcl-2 expression in target cells leads to functional inhibition of caspase-3 protease family in human NK and lymphokine-activated killer cell granule-mediated apoptosis. *Journal of Immunology*, **159**;126-134.

Rivers, T.M., Sprunt, D.H., Berry, G.P. 1933: Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *Journal of Experimental Medicine*, **58**; 39-53.

Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P., Hay, R.T. 1999: SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO Journal*, **18**; 6455-6461.

Rothwell, P.M., Charlton, D., 1998: High incidence and prevalence of multiple sclerosis in south east Scotland: evidence of a genetic predisposition. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **64**; 730-735.

Runmarker, B., Martinsson, T., Wahlstrom, J., Anderson, O. 1994: HLA and prognosis in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, **211**; 385-390.

Ryan, K.M., Phillips, A.C., Vousden, K.H. 2001: Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology*, **13**; 332-337.

Sadovnick, A.D., Baird, P.A., Ward, R.H. 1988: Multiple Sclerosis: updated risks for relatives. *American Journal of Medical Genetics*, **29**; 533-541.

Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P., Bulman, D. Hashimoto, L., Paty, D.W., Hashimoto, S.A., Warren, S., Hader, W., Murray, T.J. et al. 1993: A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Annals of Neurology*, **33**; 281-285.

Sarkar, G., Yoon, H.S., Sommer, S.S. 1992: Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Research*, **20**; 871-878.

Sawcer, S., Goodfellow, P.N., Compston, A. 1997: The genetic analysis of multiple sclerosis. *TIG*, **13**; 234-239.

Scolding, N., Franklin, R., Stevens, S., Heldin, C.-H., Compston, A., Newcombe, J. 1998: Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain*, **121**; 2221-2228.

Selmaj, K., Raine, C.S., Farooq, M., Norton, W.T., Brosnan, C.F. 1991: Cytokine Cytotoxicity against Oligodendrocytes. *The Journal of Immunology*, **147**; 1522-1529.

Shibasaki, H., McDonald, W.I., Kuroiwa, Y. 1981: Racial modification of clinical picture of multiple sclerosis: comparison between British and Japanese patients. *Journal of Neurological Sciences*, **49**; 253-271.

Shieh, S-Y, Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., Prives, C. 2000: The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & Development*, **14**; 289-300.

Soane, L., Rus, H., Niculescu, F., Shin, M.L. 1999: Inhibition of Oligodendrocyte Apoptosis by Sublytic C5b-9 Is Associated with Enhanced Synthesis of bcl-2 and

Mediated by Inhibition of Caspase-3 Activation. The Journal of Immunology, **163**; 6132-6138.

Song, Q., Lees-Miller, S.P., Zhang, N., Chan, D.W., Smith, G.C.M., Jackson, S.P., Alnemri, E.S., Litwack, G., Khanna, K.K., Lavin, M.F. 1996: DNA-dependend protein kinases catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. EMBO Journal, **15**; 3238-3246.

Sriram, S., Stratton, C.W., Yao, S., Tharp, A., Ding, L., Bannan, J.D., Mitchell, W.M. 1999: Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. Annals of Neurology, **46**; 6-14.

Stadelmann, C., Lassmann, H. 2000: Detection of apoptosis in tissue sections. Cell Tissue Research, **301**; 19-31.

Strasser-Fuchs, S., Fazekas, F., Deisenhammer, F., Nahler, G., Mamoli, B. 2000: The Austrian Immunoglobulin in MS (AIMS) study: final analysis. Multiple Sclerosis, **6** Suppl. 2; 9-13.

Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirer, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. 1995: Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose)polymerase. Cell, **81**; 801-809.

Tienari, P.J., Kuokkanen, S., Pastinen, T., Wikstrom, J., Sajantila A., Sandberg-Wollheim, M., Palo, J., Peltonen, L. 1998: Golli-MBP gene in multiple sclerosis susceptibility. Journal of Neuroimmunology, **81**; 158-167.

Vandenbroeck K., Opdenakker G., Goris A., Murru R., Billiau A., Marrosu M.G. 1998: Interferon-gamma gene polymorphism-associated risk for multiple sclerosis in Sardinia. Annals of Neurology, **44**; 841-842.

Vousden, K.H. 2000: p53: death star. Cell, **101**; 691-694.

Vousden, K.H., vande Woude, G.F. 2000: The ins and outs of p53. *Nature Cell Biology*, **2**; E178-E180.

Weinshenker, B.G., Santrach, P. Bissonet, A.S., McDonnel, S.K., Schaid, D., Moore, S.B., Rodriguez, M. 1998: Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-based study. *Neurology*, **51**; 742-747.

Weinshenker, B.G. 2001: Plasma exchange for severe attacks of inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Journal of Clinical Apheresis*, **16**; 39-42.

Wosik, K., Antel, J. Kuhlmann, T., Brück, W., Massie, B. Nalbatoglu, J. 2002: Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53. Submitted.

Woods, D.B., Vousden, K.H. 2001: Regulation of p53 function. *Experimental Cell Research*, **264**; 56-66.

Yu, J, Zhang, L, Hwang, P.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 2001: PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular Cell*, **7**;673-82.

Zipp, F., Otzelberger, K., Dichgans, J, Martin, R., Weller, M. 1998: Serum CD95 of relapsing remitting multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis. *Journal of Neuroimmunology*, **86**; 151-154.

Michael Glas

Zionskirchstr. 13, 10119

Persönliche Angaben:

Nationalität: deutsch

Geburtsdatum: 10.09.1976

Geburtsort: Bayreuth

Ausbildung:

- | | |
|--------------------|---|
| 10/2002 - 09/2003: | Studium der Medizin an der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin |
| 10/1997 - 09/2002: | Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. |
| 12/2003: | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: folgt) |
| 09/2002 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0; Prozentrang: > 95 %) |
| 08/2000: | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2; Prozentrang: > 95 %) |
| 09/1999: | Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,0; Prozentrang : >90%) |
| 06/1996: | Abitur am Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth (Note: 1,7) |

Praktika:

- | | |
|--------------------|--|
| 08/2003 – 09/2003: | Elective Cardiothoracic and Surgical ICU, Lenox Hill Hospital, NYU School of Medicine, New York. Aufgaben: Intensivmedizinische Betreuung nach viszeralchirurgischen u. herzchirurgischen Eingriffen, Therapieverordnung und -verlauf |
| 06/2003 – 08/2003: | Unterassistentenstelle in der Chirurgischen Klinik des Stadtspital Waid, Zürich. Aufgaben: Erste u. zweite Assistenz bei Eingriffen d. gesamten viszeralchirurgischen, traumatologischen u. periphergefäßchirurgischen Spektrums, primäre Wundversorgung u. selbständiges Ausführen kleiner chirurgischer Eingriffe, Patientenuntersuchung und Aufnahme, Arztbriefe u. Therapieverlauf |

- 02/2003 – 06/2003: Praktisches Jahr in der der Klinik für Kardiologie u. Pulmologie, Klinik für Gastroenterologie (Schwerpunkt: Endokriologie) der Charité Berlin Campus Mitte. Aufgaben: Patientenuntersuchung und Aufnahme, Therapieverordnung und -verlauf, Arztbriefe, selbständige Durchführung von Cardioversionen, Teilnahme an Herzkatheter- und Echokardiographieuntersuchungen
- 10/2002 – 02/2003: Praktisches Jahr im Institut für Radiologie der Charité Berlin Campus Mitte. Aufgaben: Selbständige Durchführung (inkl. Aufklärungsgespräch) u. Befundung von radiologischen u. neurora-diologischen CT-, MRT-, Ultraschall- und Röntgenuntersuchungen
- 08/2001 – 02/2002: Studentische Hilfskraft am Institut für Neuropathologie der Charité Berlin. Methoden: Zellkultur, In-Situ-Tailing, Western-Blot
- 09/2001 – 10/2001: Famulatur in der Neurologischen Abteilung des Kaiser-Franz-Josef-Spitals, Wien. Aufgaben: Patientenuntersuchung (inkl. EMG, EEG, Ultraschall) und Aufnahme, Therapieverordnung und -verlauf
- 03/2001 – 04/2001: Famulatur in der Chirurgischen Klinik des Stadtspital Waid, Zürich. Aufgaben: Erste u. zweite Assistenz bei Eingriffen des gesamten viszeralchirurgischen, traumatologischen u. periphergefäßchirurgischen Spektrums, primäre Wundversorgung u. selbständiges Ausführen kleiner chirurgischer Eingriffe, Patientenuntersuchung und Aufnahme, Arztbriefe u. Therapieverlauf
- 03/2000 – 04/2000: Famulatur in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité Campus Virchow Klinikum. Aufgaben: Narkoseeinleitung, Beatmung, Intubation, Narkoseüberwachung
- 07/1996 – 07/1997: Zivildienst an der Chirurgischen und Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Aufgaben: Pflegedienst, Patientenlagerung für Operationen

Publikationen:

Kuhlmann, T., **Glas, M.**, zum Bruch, C., Mueller, W., Weber, A., Zipp, F., Brueck, W.: Investigation of bax, bcl-2, bcl-x and p53 gene polymorphisms in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2002 Aug;129(1-2):154-60.

Kuhlmann, T., **Glas, M.**, zum Bruch C., Stadelmann, C., Lassmann, H., Brueck, W.: Increased p53 expression in MS lesions is not caused by p53 mutations. Submitted.

Kuhlmann, T., Stadelmann, C., **Glas, M.**, Zum Bruch, C., Brueck, W.: NO induces apoptotic cell death in OLN-93. Submitted.

Sprachen:

Englisch: 7 Jahre (fließend)

Französisch: 5 Jahre (fließend)

Italienisch 1 Jahr (Grundkenntnisse)

Latein: 5 Jahre

PC-Kenntnisse:

Sicherer Umgang mit MS-Office Anwendungen

Andere Interessen:

Wirtschaft, Politik, Bildende Kunst, Literatur, Fussball

Danksagung

Folgenden Personen gebührt mein herzlicher Dank:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Brück für die Überlassung des Themas und die kritische und sorgfältige Durchsicht der Niederschrift.

Frau Dr. Tanja Kuhlmann für die allzeit gleichermaßen freundschaftliche wie kompetente Betreuung.

Frau Dr. Christine Stadelmann und Herrn Dr. Wolf Müller für vielen wertvollen Tips und Anregungen.

Frau Cordula zum Bruch für die Einarbeitung in die Methoden und die stete Hilfe bei ihrer Anwendung.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt wurde. Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel und die Literatur sind vollständig angegeben.